



## **TESIS DOCTORAL**

# **“ESTUDIO DE LOS MICRODOMINIOS DE SISTEMAS REDOX Y DE TRANSPORTE DE CALCIO EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE NEURONAS”**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por:**

**DORINDA MARQUES DA SILVA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA**

2012





## **TESIS DOCTORAL**

# **“ESTUDIO DE LOS MICRODOMINIOS DE SISTEMAS REDOX Y DE TRANSPORTE DE CALCIO EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE NEURONAS”**

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por:**

**DORINDA MARQUES DA SILVA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
Y GENÉTICA**

Conformidad de lo Director

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Carlos Gutiérrez Merino", is positioned above the printed name.

**Fdo. CARLOS GUTIÉRREZ MERINO**

2012







El trabajo de investigación de esta Memoria ha sido financiado con cargo a los proyectos BFU2007-67740 y BFU2011-30178 del Plan Nacional de I+D del Ministerio de Ciencia y Innovación (I.P. Prof. Dr. Carlos Gutiérrez Merino), así como con cargo a las “Ayudas al Grupo de Investigación CCV008” de la Junta de Extremadura de referencia GRU09110 y GR10092 con co-financiación FEDER.

Dorinda Marques da Silva es beneficiaria de una beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador de referencia BES-2008-008486 del Ministerio de Ciencia y Innovación asociada al proyecto de investigación BFU2007-67740, en el Organismo Universidad de Extremadura.



**GOBIERNO DE EXTREMADURA**  
Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Una manera de hacer Europa





CARLOS GUTIÉRREZ MERINO, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Extremadura, en calidad de Director de la Tesis Doctoral presentada por D<sup>a</sup> Dorinda Marques da Silva,

INFORMA, que da el Visto Bueno y autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral.

Badajoz, 26 de junio de 2012.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Carlos Gutiérrez Merino', with a stylized flourish at the end.

Fdo. Carlos Gutiérrez Merino



# Agradecimientos

Un gran agradecimiento a todos los que en algún sentido y en cualquier momento estuvieron presentes lo largo de estos cuatro años. La más pequeña contribución, aunque no lo pudiera parecer, ha sido importante en la realización y conclusión de esta Tesis de Doctorado.

Es incuestionable el agradecimiento que debo a mi Profesor Doctor Carlos Gutiérrez Merino por ser un ejemplo de dedicación y principalmente de persona. Agradezco por la oportunidad de trabajar en su laboratorio, su paciencia, perspicacia, comprensión y su siempre presente disponibilidad.

Agradezco al Doctor Alejandro Samhan Arias, a la Doctora Teresa Tiago y al Prof. Doctor Aureliano Alves por lo que me han enseñado y por la posibilidad de aprender trabajando con ellos.

Esto camino en tierra de extremos habría sido más difícil si no hubiera conocido a Ricardo, Rui, Ilária, María y Sofía que me han puesto un café en la mano o una sonrisa en la cara y así una fuerza para seguir adelante.

Agradezco a Vera, Bibi, Carina y Miguel por las alegrías que me han aportado en este periodo.

A mis padres y a mis hermanas por todo. Sin su apoyo esto habría sido imposible.



## *Índice*



<b>Índice</b> .....	<b>I</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>V</b>
<b>Resumen/Abstract</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Calcio y estrés oxidativo en neuronas .....	3
1.2. Microdominios y señalización celular vía sistemas redox/calcio en neuronas.....	8
1.3. Importancia de las proteína quinasas en la regulación de la entrada y salida del calcio del citoplasma neuronal .....	17
1.4. FRET ( <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> ).....	21
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>27</b>
3.1. Equipos científicos y reactivos utilizados.....	29
3.2. Material biológico.....	31
3.3. Tampones y disoluciones utilizadas.....	31
3.4. Cuantificación y determinación de proteínas.....	32
3.5. Preparación de las neuronas granulares del cerebelo (CGN).....	33
3.6. Tratamientos realizados en las neuronas granulares del cerebelo.....	35
3.7. Estudios de localización de proteínas en la membrana plasmática de las CGN...37	
3.8. Estudios de FRET.....	38
3.9. Estudios de inmunoprecipitación.....	41
3.10. Determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ libre intracelular en las CGN <i>in vitro</i> .....	42
3.11. Cuantificación del colesterol.....	47
3.12. Análisis estadístico.....	48
<b>4. Resultados</b> .....	<b>49</b>
4.1. Localización de los principales sistemas de entrada y de salida de calcio en microdominios proteicos asociados a los <i>rafts</i> lipídicos de las neuronas granulares de cerebelo.....	51
4.2. Sistemas redox presentes en los submicrodominios asociados a los <i>rafts</i> lipídicos.....	81
4.3. Co-localización de los sistemas de transporte de calcio y de los sistemas redox asociados a los <i>rafts</i> lipídicos dentro de la distancia de FRET en las neuronas granulares del cerebelo.....	87

4.4. Sistemas más relevantes en la homeostasis de la concentración del calcio intracelular en neuronas granulares del cerebelo .....	97
4.5. Importancia de la organización de los sistemas de transporte de calcio en microdominios asociados a los <i>rafts</i> lipídicos para el control de la homeostasis del calcio citosólico de las neuronas granulares del cerebelo maduras <i>in vitro</i> .....	105
4.6. Modulación de la homeostasis del calcio citosólico en las CGN por proteínas quinasas.....	115
4.7 Efectos de agentes moduladores de la función celular sobre la localización de los sistemas redox asociados a <i>rafts</i> lipídicos y sobre la homeostasis del calcio citosólico.....	123
<b>5. Discusión.....</b>	<b>133</b>
<b>6. Conclusiones/Conclusions.....</b>	<b>149</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>155</b>



## *Abreviaturas*



**AFR:** Radical libre de ascorbato

**APV:** (2R)-amino-5-phosphonopentanoate

**Ara-C:** Citosina- $\beta$ -D-arabino-furanósido

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CaM:** Calmodulin

**cAMP:** Adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico

**CaMKII:** Proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina

**CaMKAP:** Proteína asociada a la CaMKII

**Cb<sub>5</sub>R:** Citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa

**CGN:** Neuronas granulares del cerebelo

**Cav1:** Caveolina-1

**Cav2:** Caveolina-2

**CPZ:** Ácido ciclopiazónico

**CTB:** Toxina B del cólera

**CTB-A555:** Toxina B del cólera conjugada con Alexa555

**DHP:** Dihydropiridina

**DIV:** Día *in vitro*

**DMEM:** “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DTNB:** 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)

**EGTA:** etilén-glicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

**Flot:** Flotillina-1

**FR:** fluorescencia roja

**FRET:** “Fluorescence Resonance Energy Transfer”

**FV:** Fluorescencia verde

**fura-2 AM:** Fura-2 acetoximetil ester

**HR:** horseradish

**HRP:** horseradish peroxidada

**IgG:** Immunoglobulina G

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**K5:** Medio extracelular con baja concentración de potasio (5 mM)

**K25:** Medio extracelular con elevada concentración de potasio (25 mM)

**KB-R7943:** 2-(2-(4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl)ethyl)isothiourea, mesilato

**LA:** Latrunculina B

**L-VOCC:** Canales de calcio de tipo L activados por voltaje

**M $\beta$ CD:** Metil- $\beta$ -ciclodextrina

**MK-801:** (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino maleato

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazolio

**NAD<sup>+</sup>:** Forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido

**NADH:** Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido

**NAD(P)H:** Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NCX:** Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>

**NMDAr:** Receptores del ácido *N*-metil-D-aspartico

**nNOS:** Óxido nítrico sintasa neuronal

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PBST:** PBS suplementado con Tween 20 ó Triton X-100

**PDZ:** Acrónimo que combina las primeras letras de las tres siguientes proteínas: PSD95,Dlg1 y zo-1

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**PMCA:** Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática

**RNS:** Especies reactivas del nitrógeno

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**SDS-PAGE:** “Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis”

**Ser478:** Residuo de serina en la posición 478

**Ser479:** Residuo de serina en la posición 479

**Ser1928:** Residuo de serina en la posición 1928

**Ser896:** Residuo de serina en la posición 896

**Ser897:** Residuo de serina en la posición 897

**Ser890:** Residuo de serina en la posición 890

**Ser1512:** Residuo de serina en la posición 1512

**Ser1570:** Residuo de serina en la posición 1570

**SERCA:** Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del retículo sarcoplasmático

**SIN-1:** 3-morpholinosydnonimine

**SNARE:** “Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion attachment receptor”

**SOD:** Superóxido dismutasas

**t<sub>½</sub>:** Tiempo de media vida

**TBS:** Tampón tris salino

**Thr498:** Residuo de treonina en la posición 498

**VOCC:** Canales de calcio activados por voltaje

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>:** Ca<sup>2+</sup> libre intracelular

**•O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido

**•NO o NO:** Óxido nítrico

**ONOO<sup>-</sup>** : Peroxinitrito

**HO•** : Radical hidroxilo

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peróxido de hidrógeno



## ***Resumen/Abstract***





## Resumen

Evidencias experimentales recientes sugieren que los sistemas transportadores de calcio más relevantes en neuronas están compartimentados en microdominios focalizados funcionalmente en la membrana plasmática. Por otra parte, estos sistemas son dianas para especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo y la alteración sostenida de la homeostasis del calcio intracelular en neuronas son características comunes en las enfermedades neurodegenerativas de mayor prevalencia. En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que el sistema redox cuya desregulación produce sobreproducción de ROS en etapas tempranas de la apoptosis en neuronas granulares de cerebelo en cultivo (CGN), forma una red de centros redox asociados a los *rafts* lipídicos en la membrana plasmática.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado la composición y estructura de estos microdominios y se ha evaluado su importancia en la modulación recíproca entre los sistemas de señalización redox y los de señalización del calcio en neuronas. Para tal fin se han utilizado una amplia gama de aproximaciones experimentales, entre las que destacan las de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) utilizando microscopía de fluorescencia con análisis de imagen de neuronas granulares de cerebelo (CGN) fijadas previamente. Se ha confirmado la presencia de los L-VOCC, del NMDAr, de la PMCA, del NCX, de la nNOS y de la  $Cb_5R$  en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos, la proximidad o intervalo de la distancia de separación entre ellos, así como la estabilidad de los microdominios en situaciones de estrés oxidativo controlado. Los resultados obtenidos utilizando *western blotting* e inmunoprecipitación de lisados de cultivos de CGN nos han permitido confirmar las principales conclusiones obtenidas en el análisis de FRET de las imágenes de microscopía de fluorescencia.

Adicionalmente, se han definido los sistemas de transporte de calcio de la membrana plasmática más relevantes en el control de la homeostasis del calcio intracelular en las CGN maduras *in vitro* y se ha estudiado el efecto de la disrupción de los *rafts* lipídicos por depleción de colesterol en la homeostasis de calcio intracelular. Finalmente, las proteínas quinasas de mayor relevancia para la regulación de la homeostasis del calcio citosólico en las CGN maduras *in vitro* han sido identificadas utilizando inhibidores específicos de las proteínas quinasas que modulan los sistemas de transporte de calcio presentes en los sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos de la membrana plasmática.



## Abstract

Recent experimental evidences suggest that the major calcium transport systems of the neuronal plasma membrane are compartmented in functional and focalized microdomains. On the other hand, these transport systems are targets for reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress and a sustained alteration of the intracellular calcium homeostasis in neurons are common features in the neurodegenerative diseases with high social incidence. Previous works of our laboratory have shown that the redox system whose deregulation leads to an overshoot of ROS in the early stages of the apoptosis of cerebellar granule neurons (CGN) forms a large network of redox centres associated with lipid rafts of the plasma membrane.

In this Ph.D. work the composition and structure of these microdomains has been studied, and their relevance for the cross-modulation of redox and calcium cellular signalling in neurons has been evaluated. To reach these goals a wide variety of experimental approaches have been used, with particular relevance of fluorescence energy transfer (FRET) imaging using fluorescence microscopy after fixation of mature CGN in culture. It has been confirmed the presence of the L-VOCC, NMDAR, the PMCA of NCX, nNOS and *Cb<sub>5</sub>R* on sub-microdomains associated with lipid rafts, the proximity or distance interval of separation between them and the stability of these microdomains after exposure to controlled oxidative stress conditions. The results obtained using western blotting and immunoprecipitation of CGN lysates yielded further experimental support to the major conclusions attained in the analysis of FRET done with quantitative fluorescence microscopy imaging.

In addition, the calcium transport systems of the plasma membrane most relevant for the control of intracellular calcium homeostasis in mature CGN have been defined, and the effect of lipid rafts disruption by cholesterol depletion on intracellular calcium homeostasis has been studied. Finally, the protein kinases involved in the regulation of cytosolic calcium homeostasis in CGN matured *in vitro* have been identified using specific inhibitors of the major protein kinases that modulate the calcium transport systems present in sub-microdomains associated with lipid rafts of the plasma membrane.



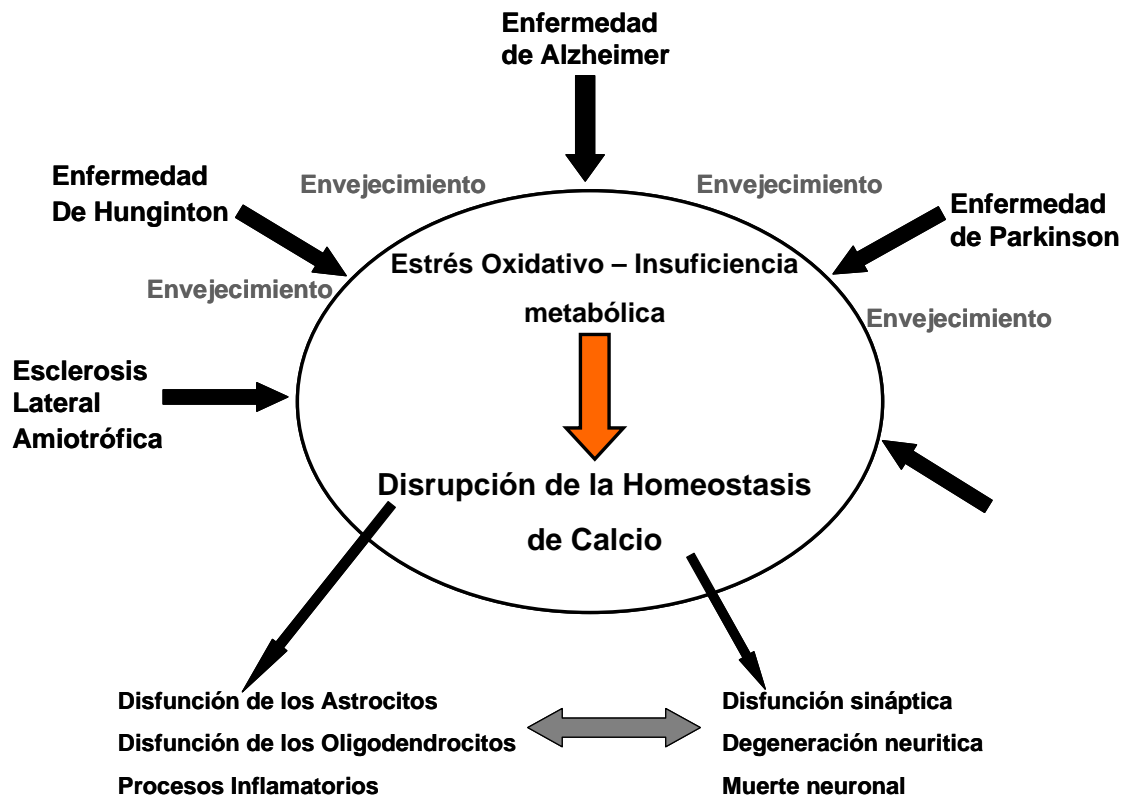
## ***1. Introducción***



## 1.1. Calcio y estrés oxidativo en neuronas.

El calcio y las especies reactivas del oxígeno (ROS) son agentes de señalización intracelulares relevantes y su sincronía permite un fino control de la homeostasis y funcionalidad del calcio y de las ROS en los diferentes tipos de células. El calcio modula la homeostasis de ROS al regular la generación y los mecanismos de eliminación de ROS, tanto en la mitocondria como en el citoplasma. Recíprocamente, el control redox de la homeostasis de calcio ocurre en diferentes procesos fisiológicos y patológicos a través de la modulación del conjunto de componentes de las vías de señalización de calcio y por alteración de las características locales y globales de las señales de calcio. Funcionalmente las interacciones entre los sistemas de señalización de calcio y de ROS pueden ser tanto estimuladoras como inhibidoras, dependiendo de las proteínas diana, las especies de ROS, la dosis, el tiempo de exposición y el microentorno celular (Triffaró y Vitale, 1993; Benowitz y Routtenberg, 1997; Berridge *et al.*, 2000).

El estrés oxidativo mediado por una elevada producción de especies reactivas del oxígeno y la alteración sostenida de la homeostasis del calcio intracelular en neuronas son características metabólicas frecuentes en las enfermedades neurodegenerativas asociadas a muerte neuronal (Cassarino y Bennett, 1999; Mattson y Chan, 2001; Hidalgo y Donoso, 2008; Gutierrez-Merino, 2008; Lagoa *et al.*, 2009). El diagrama de la figura 1 ilustra este punto. Apoptosis y necrosis son las dos principales formas de muerte neuronal que se han descrito en el sistema nervioso, y ha sido demostrado que alteraciones en la homeostasis del calcio neuronal pueden provocar apoptosis en situaciones donde la concentración de calcio citosólica se mantiene muy baja de manera sostenida (Franklin y Johnson, 1992; Franklin y Johnson, 1994), o una rápida muerte celular por necrosis mediada por la activación de calpainas cuando la concentración del calcio citosólico se mantiene elevada de manera sostenida (Choi, 1988a; Orrenius *et al.*, 1989; Franklin y Johnson, 1992; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005; Garcia-Bereguian *et al.*, 2008). Por consiguiente, la concentración del calcio citosólica puede ser considerada como un marcador bioenergético de primer orden para la actividad neuronal y para la supervivencia neuronal.



**Figura 1** – Diagrama ilustrativo del papel central de la homeostasis de calcio intracelular en la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento. Varios factores genéticos y ambientales pueden provocar o incrementar el riesgo de desórdenes neurodegenerativos. No obstante, cada factor es también responsable de un incremento del estrés oxidativo y de alteraciones metabólicas que producen disrupción de la homeostasis de calcio neuronal resultando en una disfunción sináptica y muerte celular. Alteraciones en la homeostasis de calcio en las células de la glia pueden ocurrir y contribuir a los procesos inflamatorios y el daño observado en la materia blanca en trastornos neurodegenerativos (adaptado de Mattson y Chan, 2003).

### 1.1. A. Estrés oxidativo en el cerebro

El estrés oxidativo es una consecuencia del desbalance entre la producción de ROS en las células o en sus inmediaciones y su eliminación por las defensas antioxidantes, lo que lleva a una acumulación de ROS que pueden generar daños nocivos a las células. El sistema nervioso está expuesto a elevados niveles de oxígeno que a través de su metabolismo generan ROS, este fenómeno asociado a que los niveles de defensas antioxidantes en el cerebro son inferiores a los presentes en otros tejidos y órganos hace que el cerebro sea particularmente sensible al daño oxidativo. Las



neuronas pueden estar expuestas a ROS generadas tanto intracelularmente como extracelularmente, ya que pueden ser producidas por células neuronales y por las no-neuronales, como microglía o células endoteliales de los vasos sanguíneos. Las fuentes de estrés oxidativo más relevantes en el cerebro incluyen:

- Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) producido durante la fosforilación oxidativa y por las cadenas redox asociadas a la membrana plasmática de neuronas, glía y células endoteliales de los vasos sanguíneos.
- El óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) producido por las óxido nítrico sintasas neuronales (nNOS), por las óxido nítrico sintasas del endotelio vascular (eNOS) y por las inducibles que se expresan en la microglía (iNOS).
- El radical libre de ascorbato
- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) generado a partir del anión superóxido en la reacción catalizada por las superóxido dismutasas (SOD)
- Peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que resulta de la reacción del óxido nítrico con el anión superóxido.
- Radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) producido a partir del peróxido de hidrógeno y del radical libre de ascorbato en reacciones de tipo Fenton catalizadas por  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$

El peroxinitrito es un potente agente biológico oxidante que resulta de la reacción rápida de óxido nítrico con anión superóxido, una reacción química controlada por difusión debido al elevado valor de la constante de velocidad,  $\sim 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Huie y Padmaja, 1993). Las concentraciones de óxido nítrico y del anión superóxido en neuronas pueden alcanzar valores micromolares en condiciones de estrés oxidativo, como las producidas en isquemia/reperfusión o inflamación (Milstien *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1998; Ducrocq *et al.*, 1999). Debido a los niveles elevados de las superóxido dismutasas (SOD) (5–10  $\mu\text{M}$ ) (Beckman, 1994), la difusión del anión superóxido en la célula tiene una corta distancia de recorrido antes de ser degradado. Asimismo, en estas condiciones, concentraciones micromolares de  $ONOO^-$  se producen transitoriamente en compartimentos celulares donde existe una producción simultánea del óxido nítrico y del anión superóxido. Este agente oxidante está implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, en el daño asociado a situaciones de isquemia/reperfusión y inflamación (Iadecola, 1997; van der Veen *et al.*, 1997), así como a la excitotoxicidad neuronal (Bolanos *et al.*, 1997; Atlante *et al.*, 2001). Además

este potente oxidante puede promover la oxidación y/o nitración de muchas biomoléculas, incluyendo residuos de tirosina (originando 3-nitrotirosina), tioles (como glutatión y tioles proteicos), DNA y fosfolípidos con ácidos grasos insaturados (Liu *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2007).

En el sistema nervioso, el anión superóxido es producido como un subproducto de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Cai y Jones, 1998; Herrero y Barja, 2000; Genova *et al.*, 2001), de la actividad de la xantina oxidasa (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Atlante *et al.*, 2000) y de la desregulación de la actividad NADH oxidasa de la membrana plasmática (Martin-Romero *et al.*, 2002a). Por otra parte, el óxido nítrico resulta de la oxidación de la L-arginina por acción de las nNOS (Marletta, 1994), pudiendo actuar como agente protector o agente nocivo dependiendo de su estado redox (Lipton *et al.*, 1993) y de su origen subcelular (Iadecola, 1997). Este señalizador celular ha sido identificado como una molécula importante y altamente versátil del sistema nervioso, inmunitario y cardiovascular que es producido por una de las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS): nNOS, eNOS y iNOS (Knowles y Moncada, 1994).

### 1.1. B. Estrés oxidativo y homeostasis del calcio neuronal en el cerebro.

Muchos procesos biológicos de gran importancia para la función neuronal son extremadamente dependientes de la concentración del calcio citosólico, como es el caso de la secreción de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Triffaró y Vitale, 1993), rutas de señalización intracelulares que median las respuestas metabólicas neuronales a estímulos extracelulares (Berridge *et al.*, 2000) y desarrollo de neuritas (Benowitz y Routtenberg, 1997). El aumento del estrés oxidativo en el cerebro es una característica común en los insultos nocivos en el cerebro, como la isquemia-reperfusión o inflamación o la lesión de la medula espinal, envejecimiento y neurodegeneración asociada con las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y con la esclerosis lateral amiotrófica (revisado en Gutiérrez-Merino, 2008). En la señalización por calcio, las ROS pueden estimular o inhibir las diferentes proteínas transportadoras de calcio (canales, bombas e intercambiadores). La regulación de esta cadena de señalización es, en buena parte, responsabilidad de los compartimientos intracelulares responsables del almacenamiento de calcio (mitocondria y retículo endoplasmático) y de los sistemas proteicos de la membrana plasmática responsables de su transporte a través de la membrana. Numerosos estudios experimentales realizados durante los

últimos 10 años han permitido concluir que las especies reactivas de oxígeno (ROS) producen una desregulación sostenida en la homeostasis del calcio citosólico neuronal conduciendo a muerte celular a través de la activación de las calpaínas (Bizat *et al.*, 2003; Volbracht *et al.*, 2005; Lagoa *et al.*, 2009). También la entrada de calcio a través de los canales de calcio de tipo L activados por voltaje (L-VOCC) tiene un papel muy relevante en el mantenimiento de las concentraciones del calcio citosólico dentro del intervalo óptimo 70 y 200 nM para la supervivencia y excitabilidad normal (Franklin y Johnson, 1994; Gutiérrez-Martín *et al.*, 2005; García-Bereguain *et al.*, 2008). Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que las alteraciones funcionales de estas proteínas por estrés oxidativo o reductivo produce la muerte de las neuronas granulares del cerebelo en cultivo por vía apoptótica o por excitotoxicidad, respectivamente (Gutiérrez-Martín *et al.*, 2005; García-Bereguain *et al.*, 2008).

En las neuronas granulares del cerebelo (CGN) maduras en cultivo, la entrada de calcio por los L-VOCC contribuye con más del 75 % al incremento del calcio en el citoplasma medido después de una despolarización parcial de la membrana plasmática inducida por el incremento de la concentración de  $K^+$  extracelular, y la apoptosis neuronal provocada por un medio con baja concentración de  $K^+$  puede ser bloqueada simplemente con un incremento de la concentración del  $K^+$  extracelular (Franklin y Johnson, 1992; Gutiérrez-Martín *et al.*, 2005). En trabajos previos de nuestro laboratorio se ha demostrado que la sobreproducción del anión superóxido en la membrana plasmática es un evento crítico para la entrada de las neuronas granulares del cerebelo en la fase irreversible de la apoptosis inducida por una concentración de  $K^+$  baja en el medio extracelular (Martin-Romero *et al.*, 2002b; Samhan-Arias *et al.*, 2004). En un trabajo posterior de nuestro laboratorio se ha demostrado que la producción de este oxidante por la membrana plasmática sináptica es dependiente de NADH (forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido) y en gran parte catalizada por la citocromo  $b_5$  reductasa ( $Cb_5R$ ) (Samhan-Arias *et al.*, 2009).

El óxido nítrico por sí mismo no es considerado una ROS perjudicial relacionada con el estrés oxidativo neuronal, ya que la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles del receptor del ácido *N*-metil-D-aspartico (NMDAr) inducida por el óxido nítrico explica la inhibición del NMDAr por el óxido nítrico en cultivos de neuronas corticales, un mecanismo que proporciona protección neuronal contra la excitotoxicidad del L-glutamato (Lei *et al.*, 1992), como ha sido demostrado utilizando el agente oxidante de tioles 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Brimecombe *et al.*, 1999). Sin

embargo, la reacción del óxido nítrico con el anión superóxido tiene una constante de velocidad muy elevada y genera peroxinitrito. Este agente oxidante es una de las especies reactivas del oxígeno más nocivas producidas en situaciones de estrés oxidativo e induce alteraciones sostenidas de la homeostasis intracelular del calcio. Considerando que una subida de la concentración del calcio citosólico conduce a la activación de la nNOS (Brenman y Bredt, 1997), las especies reactivas del nitrógeno (RNS) son moléculas de particular relevancia como mensajeros intracelulares en la coordinación o desregulación de las vías de señalización de calcio y ROS en neuronas. Por ejemplo, la exposición de neuronas al peroxinitrito induce una fuerte y sostenida activación de la entrada de calcio a través del NMDAr lo que produce la muerte neuronal por excitotoxicidad (Bolaños *et al.*, 1997; Beal, 2002). Adicionalmente, en cultivos de neuronas granulares de cerebelo la exposición sostenida a concentraciones micromolares de peroxinitrito inhibe la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), si bien los L-VOCC son más sensibles a este agente neurotóxico en estas neuronas puesto que son inhibidos por exposiciones de menor duración a concentraciones submicromolares de peroxinitrito (Gutierrez-Martin *et al.*, 2005). Otros estudios con células OK-PTH y CHO-K1 han demostrado el efecto inhibitorio de este potente oxidante en los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) de la membrana plasmática (Cassarino y Bennett, 1999; Fiskum, 2000; Unlap *et al.*, 2003), lo que produce un incremento sostenido en la concentración del calcio citosólico en estas células, es decir, una desregulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

### 1.2. Microdominios y señalización celular vía sistemas redox/calcio en neuronas.

Los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática definen microdominios que compartimentalizan procesos celulares, de pequeña amplitud (10-200 nm) y caracterizados por su heterogeneidad, por su carácter dinámico y por estar enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (Pike, 2006). También ha sido descrita la presencia de gangliósidos dentro de estos microdominios (Anderson, 1998), un punto particularmente relevante en el cerebro, debido a la alta concentración de estos lípidos en la membrana plasmática neuronal. Además, los *rafts* lipídicos definen submicrodominios de la membrana plasmática de anclaje de caveolinas, flotillinas y

también microfilamentos de actina (O' Connell *et al.*, 2004). La caveolina-1 se une a los dos principales componentes de los *rafts* lipídicos, al colesterol y a los esfingolípidos (Fra *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1995; Thiele *et al.*, 2000) y, por otra parte, promueve el transporte de colesterol desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática (Smart *et al.*, 1996), donde se encuentran estos microdominios.

### 1.2. A. Caveolas y colesterol

Las caveolas son consideradas como *rafts* lipídicos especializados, morfológicamente distintos de los *rafts* lipídicos por tener una estructura semejante a una invaginación derivada de la presencia de caveolinas. Son estructuras dinámicas que están ancladas a la membrana plasmática a través del citoesqueleto de actina, pero hay muchas evidencias de que las caveolas también existen intracelularmente (Pelkmans *et al.*, 2001; Pelkmans *et al.*, 2002). Las vesículas asociadas a caveolina están implicadas en el tráfico entre los diferentes compartimentos asociados a las caveolinas (van Deurs *et al.*, 2003).

Las caveolas no funcionan sólo como un elemento estructural en la membrana plasmática, puesto que las caveolinas también actúan como proteínas “scaffolding” a través de la interacción directa con moléculas localizadas en estos microdominios y consecuente modulación de su actividad (Razani *et al.*, 2002; van Deurs *et al.*, 2003). Las caveolas deben ser consideradas como componentes celulares multifuncionales con un papel fisiológico que varía dependiendo del tipo de célula y de sus necesidades funcionales. En la actualidad, hay ya una extensa lista de proteínas identificadas en las caveolas (Razani *et al.*, 2002). Citaremos como ejemplos característicos la formación de complejos por interacción de las caveolinas con algunas proteínas G, con receptores de factores de crecimiento y con algunas tirosina quinasas. Además, también se han localizado en las caveolas enzimas como adenilato ciclasas, fosfatasas, eNOS, nNOS, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa C (PKC), bombas iónicas, canales iónicos (especialmente de iones  $\text{Ca}^{2+}$ ) y proteínas sinápticas. La agregación de los canales de calcio activados por voltaje (VOCC) y de proteínas SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion attachment receptor) responsables de la fusión de vesículas, focalizados en los microdominios lipídicos de las terminales pre-sinápticas, tienen un papel relevante en la organización de sitios focalizados en la membrana plasmática para la exocitosis de las vesículas sinápticas (Taverna *et al.*, 2004). Sin embargo, la formación

y función detallada de los complejos proteicos sinápticos y el papel que desempeñan las interacciones con los canales de calcio en el ajuste fino de la regulación de la transmisión sináptica aún no está bien comprendido.

En neuronas de hipocampo, ha sido demostrado que el glutamato regula la expresión de caveolina, indicando una función para las caveolas en eventos de transducción de señales en neuronas (Bu *et al.*, 2003). En este sentido debe notarse que las alteraciones en la función de *rafts* lipídicos y caveolas han sido asociadas a varias enfermedades (Simons y Ehehalt, 2002; Cohen *et al.*, 2004). Así, la expresión de caveolina se incrementa en enfermedades como Alzheimer (Gaudreault *et al.*, 2004) y el incremento del nivel de colesterol celular es una característica de esta enfermedad, que está asociado a la sobre-expresión de la caveolina (Gaudreault *et al.*, 2004). Por otra parte, en ratones knockout en caveolina-1 la ausencia de caveolas afecta las vías de señalización de óxido nítrico y de calcio, conducen a graves defectos vasculares y pulmonares, así como a una proliferación celular no controlada (Drab *et al.*, 2001). Mutaciones en caveolinas se han asociado con varios desórdenes musculares y formación de tumores (Razani *et al.*, 2002). No obstante, algunas células y también animales knockout caveolina-1 logran sobrevivir sin caveolas, lo que sugiere la existencia de una vía compensatoria sin propiedades de caveola (Parton, 2001).

La caveolina-1 une directamente y está fuertemente asociada a colesterol libre (Murata *et al.*, 1995), además para que ocurra la formación de caveolas es necesario un elevado contenido en colesterol celular. No es de sorprender, pues, que una depleción de colesterol conduzca a una disminución del número de caveolas. El colesterol es un importante regulador de la organización de la membrana lipídica (Goldstein y Brown, 2001; Maxfield y Tabas, 2005), ya que este esteroide influye en propiedades físicas de las membranas como la organización de fosfolípidos, fluidez y elasticidad de la membrana y estimula la fusión de membranas (Churchward *et al.*, 2005). Los dominios ricos en colesterol (*rafts* lipídicos) de la membrana celular agregan proteínas receptoras y las respectivas moléculas de señalización intracelulares que se asocian a estos receptores (Gulbins y Li, 2006). Como una alteración de la composición lipídica de la membrana cambia el entorno en el cual las proteínas están presentes, cualquier proceso que dependa de la función de una proteína de membrana puede ser afectado por alteraciones de la composición de los lípidos de la membrana. Así, por ejemplo, el contenido en colesterol ha sido demostrado que tiene un papel significativo en la función de las proteínas transmembrana (Bastiaanse *et al.*, 1997). La depleción de colesterol por la

metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) ha sido reportado que modula la corriente basal de los L-VOCC en células del músculo esquelético fetal de ratones y cardiomiocitos (Pouvreau *et al.*, 2004; Tsujikawa *et al.*, 2008), y además provoca una alteración de la forma de las caveolas hacia una forma más achatada (Rothberg *et al.*, 1992; Westermann *et al.*, 2005). También en sinaptosomas la exocitosis dependiente de calcio es sensible al contenido de colesterol en la membrana plasmática (Waseem *et al.*, 2006). Precisamente una de las funciones mejor documentada de las caveolinas es la implicación del tráfico intracelular de la caveolina-1 en el mantenimiento de la homeostasis de colesterol (Fielding y Fielding, 1997). La caveolina une el colesterol con una relación molecular 1:1 (Murata *et al.*, 1995) y además otro estudio ha demostrado que es la proteína celular que interacciona más fuertemente con el colesterol (Thiele *et al.*, 2000). Consistente con estos resultados la expresión de caveolina en células sin caveolas provoca enriquecimiento de colesterol en una fracción flotante insoluble en detergente de baja densidad (Pike *et al.*, 2002).

La presencia de caveolinas asociadas a la membrana plasmática neuronal en microdominios sin el aspecto morfológico de invaginaciones de tipo caveolas ha sido documentada en la última década y revisada en (Head y Insel, 2007). Por tanto, estos microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos tienen propiedades para actuar como plataformas únicas en las vías de transducción de las señales intercelulares y ha sido sugerido que los nanodominios enriquecidos en caveolinas pueden servir para focalizar la transducción de señalización celular en neuronas (Toselli *et al.*, 2005; Head y Insel, 2007; Head *et al.*, 2008). La estabilidad de estos dominios se racionaliza usualmente en términos de interacciones proteína-proteína y/o proteína-lípido y debe notarse que la compartimentación de proteínas en los microdominios permite un acoplamiento más eficiente y funcional entre ellas. Esto es particularmente relevante en la actividad neuronal, porque las neuronas tienen que responder rápidamente a muchos estímulos simultáneos extracelulares provenientes de diferentes células vecinas. Los estudios sobre la señalización del calcio en neuronas han desempeñado un papel pionero en demostrar la importancia de la compartimentación subcelular en el control de la actividad neuronal (Berridge *et al.*, 2000; Parekh, 2008).

### 1.2. B. Compartimentación de los sistemas de transporte de calcio en neuronas.

La compartimentación de los sistemas de transporte de calcio más relevantes para la actividad neuronal en los microdominios de la membrana plasmática es una posibilidad que empieza a emerger. Esto es de una elevada importancia para la modulación de la amplitud de los picos del calcio citosólico y también para la tasa de atenuación de los gradientes locales de calcio en neuronas, porque (i) consiguen promover una estimulación focalizada de proteínas que unen calcio en regiones intracelulares de pequeño volumen, un proceso muy importante en las respuestas neuronales asociadas a eventos de tipo sináptico, y (ii) permiten una rápida restauración de la homeostasis del calcio en el citoplasma, protegiendo las neuronas de la fuerte citotoxicidad del calcio a concentraciones superiores a 0,3–0,4  $\mu\text{M}$ . Ambos efectos funcionales son importantes debido a la rapidez con que las neuronas tienen que adaptarse a la gran cantidad de estímulos externos provenientes simultáneamente de diferentes células vecinas. La compartimentación de proteínas dentro de microdominios permite un acoplamiento físico y funcional entre componentes moleculares críticos en la activación o inactivación de los canales de calcio en la membrana plasmática y por esta vía controlan la concentración del calcio intracelular. Evidencias experimentales recientes sugieren que los sistemas transportadores de calcio más relevantes en neuronas están compartimentalizados en microdominios focalizados funcionalmente en la membrana plasmática (Gutiérrez-Merino, 2008; Parekh, 2008). La posible implicación de los *rafts* lipídicos en la regulación de la homeostasis y señalización del calcio intracelular fue sugerida hace unos 30 años (Gabella, 1971; Popescu, 1974), pero solo recientemente se ha demostrado esta hipótesis (Brazer *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2007). Asimismo, el acoplamiento funcional y eficiente de diversos sistemas principales de transporte de calcio de la membrana plasmática permite un control fino de la homeostasis del calcio citosólico dentro del reducido intervalo requerido para la supervivencia neuronal (Franklin y Johnson, 1992; Franklin y Johnson, 1994; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005; Garcia- Bereguian *et al.*, 2008). Los sistemas más relevantes y frecuentes en el transporte de calcio implicados en homeostasis neuronal de calcio citosólico son: los NMDAr y los L-VOCC que actúan como sistemas de entrada de calcio y la PMCA y el NCX que actúan como sistemas de extorsión de calcio (Berridge, 1998; Berridge *et al.*, 2000; Brini y Carafoli, 2000; Gutierrez-Merino, 2008).



La entrada de calcio por los L-VOCC y por los NMDAr tiene un papel de extrema importancia en el mantenimiento de la concentración del calcio citosólico necesario para la supervivencia y excitabilidad de las neuronas granulares de cerebelo maduras (Balázs *et al.*, 1988; Franklin y Johnson, 1992; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005). Los L-VOCC son los VOCC más relevantes en la regulación de homeostasis del calcio citosólico y adicionalmente de la excitabilidad neuronal (Marchetti y Usai, 1996; Gao *et al.*, 1998; Maric *et al.*, 2000; Arakawa *et al.*, 2002). La familia de los L-VOCC, también conocidos como Ca<sub>v</sub>1, está constituida por cuatro subtipos diferentes: Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3 y Ca<sub>v</sub>1.4 (Ertel, 2000). De estos subtipos, el Ca<sub>v</sub>1.1 y el Ca<sub>v</sub>1.4 son específicos del músculo-esquelético y de la retina, respectivamente. Los subtipos Ca<sub>v</sub>1.2 y el Ca<sub>v</sub>1.3 están presentes en células cardíacas, células endocrinas y en neuronas (Catterall, 2000), además ha sido demostrado que en cerebro los Ca<sub>v</sub>1 son un 10-25 % del subtipo Ca<sub>v</sub>1.3 y aproximadamente un 80 % del subtipo Ca<sub>v</sub>1.2 (Clark *et al.*, 2003). La importancia neurofisiológica del subtipo Ca<sub>v</sub>1.2 se ha demostrado en ratones con desactivación del gene CACNA1C (Ca<sub>v</sub>1.2) en el hipocampo y en el neocórtex (Ca<sub>v</sub>1.2HKO), en los que se observó una pérdida selectiva de la potenciación a largo plazo independiente del NMDAr (Moosmang *et al.*, 2005).

En cultivos primarios de CGN maduras la entrada de calcio por el L-VOCC es de una importancia crítica para mantener el calcio citosólico dentro del intervalo 70-200 nM de concentración óptima necesaria para la supervivencia de estas neuronas *in vitro* (Franklin y Johnson, 1992; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005; Garcia-Bereguian *et al.*, 2008). La entrada de calcio a través de la apertura del L-VOCC puede generar concentraciones de calcio transitorias del orden micromolar hasta distancias de 100 nm desde el L-VOCC dependiendo de la capacidad tampón del microentorno que rodea a los canales (Parekh, 2008). Se ha demostrado que los canales de calcio de tipo L (L-VOCC) están localizados en microdominios asociados a *rafts* lipídicos en cardiomiocitos (O' Connell *et al.*, 2004; Balijepalli *et al.*, 2006) y que en el cerebelo la subunidad  $\alpha 2\delta 2$  está presente en los *rafts* lipídicos donde se une a la caveolina (Davies *et al.*, 2006). Por otra parte, estudios en miocitos han revelado que la depleción de colesterol afectaba el acoplamiento de los L-VOCC con otras proteínas reguladoras afectando su función (Tsujikawa *et al.*, 2008). Adicionalmente se han demostrado las interacciones de los subtipos Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>1.3 con diferentes subconjuntos de proteínas PDZ (Weick *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005). También a estos dominios de proteínas PDZ se ha demostrado la unión del NMDAr (Prybylowski *et al.*, 2005).

Los NMDAr desempeñan un papel extremadamente importante en la plasticidad neuronal y en procesos de potenciación a largo plazo (Nicoll y Malenka, 1995), por lo tanto, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de los NMDAr tiene un papel muy importante en la plasticidad sináptica durante el desarrollo del cerebro, así como en el cerebro adulto. Estas proteínas están constituidas por subunidades NR1 formando diferentes combinaciones con las subunidades NR2A-D (Kutsuwada *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1992; Monyer *et al.*, 1994). Los agentes químicos que modulan la neurotransmisión por glutamato, han adquirido un gran interés farmacológico y clínico en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, como la esquizofrenia, depresión, ansiedad, adicción, dolor, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas (Heresco-Levy y Javitt, 1998; Cull-Candy *et al.*, 2001). Aproximadamente la mitad de las sinapsis en el cerebro son sinapsis excitatorias que utilizan el glutamato como neurotransmisor, las CGN son neuronas glutamatérgicas que expresan el NMDAr (Balázs *et al.*, 1988; Resink *et al.*, 1995), y una subida en la concentración del calcio citosólico es un factor primario determinante en la liberación de neurotransmisores. También el glutamato, actuando a través de los NMDAr, puede desregular la homeostasis de calcio intracelular y conducir a una muerte neuronal por excitotoxicidad (Choi, 1988b; Beal, 2000). Por otra parte, también ha sido demostrada la presencia del NMDAr en los *rafts* lipídicos (Hering *et al.*, 2003, Besshoh *et al.*, 2007; Delínte-Ramírez *et al.*, 2008). Delínte-Ramírez y colaboradores (2008) han sugerido que su localización en estos *rafts* lipídicos puede incrementar la eficiencia de la transducción de señal inducida por la activación del NMDAr y por consiguiente la presencia de estas proteínas en los *rafts* lipídicos puede servir como un mecanismo de potenciación sináptica en procesos neuronales. Posteriormente este mismo grupo (Delínte-Ramírez *et al.*, 2010) ha descrito que, en estudios con ratones genéticamente modificados, la eliminación del dominio C-terminal en la subunidad NR2A o la eliminación del residuo valina en el C-terminal de la subunidad NR2B, lo que elimina las interacciones con proteínas con dominios PDZ, reducen la asociación de la subunidad NR1 a los *rafts* lipídicos. Ha sido también demostrado que el citoesqueleto de actina modula la actividad del NMDAr (Bonfoco *et al.*, 1996) y del NCX de la membrana plasmática (Condrescu y Reeves, 2006).

Todas las neuronas expresan los dos sistemas principales de la membrana plasmática para la extrusión de calcio desde el citosol: el NCX y la PMCA. La activación del NCX ocurre para concentraciones  $\geq 0.4 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma y permite la recuperación de la concentración del calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )

hasta los bajos niveles citosólicos del mismo compatibles con la supervivencia neuronal (Carafoli *et al.*, 2001; Gill *et al.*, 1984). La asociación de esta proteína a los *rafts* lipídicos se ha demostrado en preparaciones de músculo liso de las arterias coronarias (Kuszczyk *et al.*, 2011) y su acoplamiento con otras proteínas unidas a los *rafts* lipídicos se ha demostrado que desencadena oscilaciones citosólicas de calcio libre en células del ovario de hámsteres Chinos (Yi *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado la interacción del NCX cardíaco con la caveolina-3 por co-precipitación (Bossuyt *et al.*, 2002) y el NCX de las células endoteliales vasculares ha sido encontrado en fracciones de membrana enriquecidas en caveolina, fracciones que contienen tanto la eNOS como la caveolina-1 (Teubl *et al.*, 1999). Por otra parte se ha demostrado la asociación de la PMCA con los *rafts* lipídicos en membranas plasmáticas sinápticas (Sepúlveda *et al.*, 2006) y en neuronas primarias corticales y de hipocampo en cultivo de rata (Jiang *et al.*, 2007). Adicionalmente, también ha sido demostrada la interacción de su dominio C-terminal con los dominios PDZ ya referidos anteriormente (Vorherr *et al.*, 1991). La PMCA es el sistema primario responsable por la extrusión del calcio desde el espacio intracelular hacia el medio extracelular (Carafoli, 1991; Garcia y Strehler, 1999), una función crítica para mantener la excitabilidad neuronal y la señalización intracelular. Esta proteína es activa a concentraciones de calcio intracelular  $< 0.4 \mu\text{M}$  (Garcia-Martin y Gutierrez-Merino, 1996; Franks *et al.*, 1998, Carafoli, 2001), y su presencia en dominios *raft* y no-*raft* aislados de neuronas primarias y células intactas ha sido descrita por Jiang y colaboradores (2007), quienes demostraron que la PMCA asociada a los dominios *raft* tiene mucho mayor actividad que la PMCA asociada a los dominios no-*raft* y la presencia de niveles superiores de asociación de esta proteína a estos microdominios. Consistentemente, la disrupción de los *rafts* por depleción crónica de colesterol disminuyó dramáticamente la actividad de las PMCA asociadas a los dominios *raft*, pero esta depleción de colesterol no afectó la actividad de la PMCA presente fuera de la zona *raft* (Jiang *et al.*, 2007).

Sin embargo, la composición proteica de estos microdominios está lejos de ser bien conocida. En neuronas, los *rafts* lipídicos podrían servir como marcadores de microdominios en la membrana plasmática de importante relevancia en la conexión entre las vías de señalización de calcio y las vías de señalización redox, porque una alteración sostenida de la homeostasis del calcio intracelular en neuronas es una característica común en los procesos neurodegenerativos de mayor prevalencia en la sociedad actual, y ha sido demostrado que los transportadores de calcio de la membrana

plasmática son dianas muy sensibles a las especies reactivas del oxígeno generadas en insultos y en enfermedades de tipo neurodegenerativo (Gutierrez-Merino, 2008; Hidalgo y Donoso, 2008).

### 1.2. C. Fuentes de estrés oxidativo en los microdominios proteicos asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática neuronal.

La NOS es una enzima oxidorreductasa, constituida por dos dominios funcionales, un dominio oxigenasa y un dominio reductasa, los cuales están conectados por un sitio de unión de la calmodulina (CaM) (Feng *et al.*, 2006). La unión de la calmodulina facilita la transferencia de electrones necesaria para la formación del óxido nítrico, así como la transferencia de electrones dentro del dominio reductasa. Las interacciones proteína-proteína de la nNOS funcionan como reguladoras de la actividad enzimática y como puntos de anclaje determinantes para la localización subcelular de esta proteína (Venema *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2006). Así, la interacción de la nNOS con la caveolina-3 en músculo esquelético modula la actividad catalítica de la NOS (Venema *et al.*, 1997), y Sato y colaboradores han descrito la interacción del dominio “scaffolding” de la caveolina-1 con los dos dominios de la nNOS (el dominio oxigenasa y reductasa) (Sato *et al.*, 2004). De ambos estudios se deriva la posible localización de la nNOS en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática. La presencia de centros redox en la membrana plasmática de células de mamíferos esta bien documentada (May, 1999; Morré *et al.*, 2000; Martin-Romero *et al.*, 2004a), y en la membrana plasmática de neuronas están presentes las siguientes actividades oxidorreductasa: NADH:DCPIP1 reductasa y NADH:ferricianuro reductasa (Zurbriggen y Dreyer, 1996; Wright y Kuhn, 2002), NADH oxidasa dependiente de ascorbato y actividad de producción de anión superóxido (Martin-Romero *et al.*, 2002a; Samhan-Arias *et al.*, 2004), NADH:AFR reductasa y NADH:coenzyma Q reductasa (Martin-Romero *et al.*, 2002a; Samhan-Arias *et al.*, 2008). La flavoproteína citocromo *b*<sub>5</sub> reductasa (*Cb*<sub>5</sub>R) tiene una extrema importancia en la cadena redox de la membrana plasmática en mamíferos (Villalba *et al.*, 1995; Kim, 2002), y se ha demostrado que otras flavoproteínas con actividad NAD(P)H oxidasa están unidas a la membrana plasmática de mamíferos, como por ejemplo en las células de la glía y en macrófagos (Kindzelskii y Petty, 2004; Brenman y Bredt, 1997).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado también que la  $Cb_5R$  forma una red de centros redox asociados a la membrana plasmática de las CGN en cultivo (Samhan-Arias *et al.*, 2009; Samhan-Arias *et al.*, 2012). Puesto que la nNOS se localiza asociadas al citoesqueleto neuronal en las terminales sinápticas (Brenman y Bredt, 1997), la liberación del anión superóxido por desregulación de los centros redox de la membrana plasmática puede producir un estrés oxidativo mediado por peroxinitrito muy focalizado en la membrana plasmática (Martin-Romero *et al.*, 2002a). El peroxinitrito es un oxidante importante en procesos neurodegenerativos producido por la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico (Szabo *et al.*, 2007), dos ROS metabólicas primarias que reaccionan entre sí con una constante de velocidad muy elevada  $\sim 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Huie y Padmaja, 1993). Ha sido demostrado que este oxidante tiene una importante relevancia en la neurodegeneración observada en la isquemia-reperfusión y en procesos inflamatorios en el cerebro (Iadecola, 1997; Liu *et al.*, 2000). Por otra parte, es bien conocido que la  $Cb_5R$  está enriquecida en el retículo endoplasmático, por lo que los trabajos previos de nuestro laboratorio sugieren que esta proteína puede ser considerada como marcador del compartimento celular recientemente denominado “endoplasmic reticulum-plasma membrane junction” (unión membrana plasmática-retículo endoplasmático), cuya asociación a *rafts* lipídicos de la membrana plasmática ha sido bien documentada durante los últimos años (Pani *et al.*, 2008; Cahalan, 2009).

### 1.3. Importancia de las proteínas quinasas en la regulación de la entrada y salida del calcio del citoplasma neuronal.

El efecto de las proteínas quinasas sobre los diferentes sistemas de entrada y salida de calcio del citoplasma ha sido ampliamente documentado en la bibliografía. La fosforilación/desfosforilación de dominios de proteínas importantes en el transporte de calcio parece modular su actividad y como consecuencia una alteración en la actividad de las proteínas quinasas o de alguna de ellas en particular puede inducir a desregulación de la homeostasis del calcio intracelular. Por otra parte, la modulación de los sistemas de calcio por proteínas quinasas es un punto importante en el control del calcio intracelular en neuronas, ya que ha sido ampliamente demostrado que la activación de las proteínas quinasas tras estimulación neuronal tiene lugar en la escala

de tiempos en la que se observan los cambios de actividad observados en los sistemas de transporte de calcio en las neuronas estimuladas.

Así, ha sido reportado que la fosforilación de la PMCA parece ser el mecanismo que controla su actividad. Zylinska y colaboradores (1998) han demostrado la implicación de PKA y de la PKC en la activación de la PMCA purificada de membranas de sinaptosomas de córtex, de cerebelo y de hipocampo de rata (Zylinska *et al.*, 1998) y la región diana de fosforilación para estas dos proteínas es el dominio C-terminal de la PMCA (Strehler y Zacharias, 2001). Otros estudios han demostrado que la PKA potencia y fosforila la PMCA de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en células acinares de la glándula parótida (Bruce *et al.*, 2002), y que la PMCA es regulada por la PKA de modo rápido y eficiente, lo que tiene importantes implicaciones funcionales durante la señalización neuronal, sugiriendo la regulación de la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) a través de la fosforilación de la PMCA por la PKA (Baggaley *et al.*, 2007). Adicionalmente, ha sido también demostrado que la fosforilación de esta proteína por la PKA y por la PKC puede llevar a un incremento de actividad de la PMCA a través del aumento de su afinidad hacia la calmodulina (Gromadzinska *et al.*, 2001).

Los L-VOCC son también modulados por proteínas quinasas, siendo las subunidades  $\alpha 1c$  y  $\beta 2$  dianas directas en la fosforilación mediada por la PKA (De Jongh *et al.*, 1996; Mitterdorfer *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1997; Puri *et al.*, 1997). El efecto de la fosforilación de los L-VOCC por las proteínas quinasas es, por tanto, una consecuencia de la activación de la cascada de procesos señalización dependientes del adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico (cAMP). Así, por ejemplo, la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos induce un sobre-estimulación de las corrientes de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de los L-VOCC (Bünemann *et al.*, 1999). La activación de la PKA subsiguiente a la estimulación del receptor  $\beta$ -adrenérgico tiene una particular importancia en la regulación de las corrientes cardíacas de los L-VOCC. La modulación del L-VOCC por parte de la PKA es debida en parte a la fosforilación de la subunidad  $\beta 2$ , ya que las mutaciones de las serina 478 (Ser478) y serina 479 (Ser479) de la subunidad  $\beta$  eliminan completamente el incremento de corrientes de calcio inducidas por la PKA a través de los L-VOCC (Bünemann *et al.*, 1999), y en parte de la subunidad  $\alpha 1c$  porque también la mutación de la Ser1928 de esta subunidad impide la fosforilación por PKA y el incremento de la actividad de este canal de calcio (Kamp y Hell, 2000). El dominio C-terminal de esta subunidad  $\alpha 1c$  tiene un papel importante en

la regulación de los L-VOCC por la PKC, pero en este caso la activación de la PKC ha resultado en una variedad de efectos en la actividad de los L-VOCC, habiéndose sugerido que distintas isoformas de la PKC promuevan efectos distintos en la actividad de estos canales de calcio (Kamp y Hell, 2000). Por otra parte, tanto la PKA como miembros de la familia de las PKC regulan la actividad de los NMDAr, desempeñando un papel esencial en la plasticidad sináptica. Leonard y Hell (1997) han demostrado que la fosforilación de los NMDAr *in vitro* por acción de la PKA y de la PKC incrementa la actividad de los NMDAr. La activación conjunta de la PKC y de la PKA produce una fosforilación simultánea de los residuos Ser896 y Ser897 del NMDAr, mientras que la fosforilación de la Ser890 por la PKC provoca una re-distribución subcelular de la subunidad NR1 que se revierte por desfosforilación. Por el contrario, la fosforilación de las Ser896 y 897 no altera la distribución subcelular de la subunidad NR1, demostrando que la fosforilación de distintos residuos de la subunidad NR1 afectan de diferente manera la distribución subcelular de esta subunidad (Tingley *et al.*, 1997).

Adicionalmente, varios trabajos han reportado la interacción de los L-VOCC y de los NMDAr con la proteína quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CaMKII) (Gallo *et al.*, 1987; Gardoni *et al.*, 2001; Grueter *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012), una proteína quinasa que también ha sido reportado que interacciona con la PMCA (Colyer, 1998; Valverde *et al.*, 2005).

La fosforilación de la treonina 498 (Thr498) de la subunidad  $\beta_{2a}$  de los L-VOCC por la CaMKII aumenta la intensidad de las corrientes de entrada de calcio a través de los L-VOCC y en el mismo estudio se demostró la co-localización de la CaMKII con la subunidad  $\beta_{2a}$  (Grueter *et al.*, 2006). En este trabajo se mostró asimismo que la secuencia de aminoácidos próxima a la Thr498 de la subunidad  $\beta_{2a}$  de los L-VOCC es muy semejante al dominio auto-inhibitorio de la CaMKII y al dominio de unión de la CaMKII en la subunidad NR2B del NMDAr. El mismo grupo sugiere que la subunidad  $\beta_{2a}$  actúa como una proteína asociada a la CaMKII (CaMKAP) que interacciona directamente con la CaMKII *in vitro* y en células intactas y que la CaMKII fosforila todas las isoformas de la subunidad  $\beta$ , pero su interacción con esta subunidad depende de la isoforma correspondiente, porque con las subunidades  $\beta_{1b}$  y  $\beta_{2a}$  consigue formar complejos estables, pero no con las subunidades  $\beta_3$  y  $\beta_4$  (Grueter *et al.*, 2008). La asociación de la CaMKII con los L-VOCC dependiente de la subunidad  $\beta$  facilita la interacción de la CaMKII con dominios adicionales de la subunidad  $\alpha 1$  (Hudmon *et al.*, 2005) y puede incrementar la fosforilación por parte de la CaMKII en otros sitios

relevantes, como la Ser1512 o la Ser1570 de la subunidad  $\alpha_1$  (Lee *et al.*, 2006) o en la Thr498 de la subunidad  $\beta_{2a}$  (Grueter *et al.*, 2006). Se ha sugerido además que la regulación del influjo de calcio vía los L-VOCC es controlada por microdominios subcelulares específicos por múltiples mecanismos que permiten la asociación de la CaMKII y otras proteínas de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  con las subunidades del canal (Grueter *et al.*, 2008). La modulación de los L-VOCC por la CaMKII puede ser importante para el incremento fisiológico de las señales celulares de calcio en respuesta a hormonas o factores de crecimiento (O-Uchi *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006). Pero la activación excesiva del subtipo de los L-VOCC  $\text{Ca}_v1.3$  se ha correlacionado con la pérdida de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado tras la disminución de dopamina en modelos animales de parkinsonismo (Day *et al.*, 2006), y con la paralela sobre-activación de la CaMKII (Brown *et al.*, 2005). Se ha sugerido que los complejos mecanismos bioquímicos de regulación del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los L-VOCC permiten una enorme flexibilidad para modular una variedad de eventos de señalización, tales como los eventos del acoplamiento excitación-contracción y excitación-transcripción cardíacos y eventos de la plasticidad neuronal sináptica (Bodi *et al.*, 2005).

Razani y colaboradores han demostrado la co-localización y la interacción directa entre el dominio “scaffolding” de la caveolina-1 y la subunidad catalítica de la PKA *in vitro* e *in vivo* (Razani *et al.*, 1999), y se ha demostrado en cerebro la asociación de la PKA con la subunidad  $\alpha_{1c}$  de los L-VOCC (Davare *et al.*, 1999). Otros estudios han identificado las isoformas de la PKC sensibles a calcio como componentes moleculares de las caveolas (Lisanti *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1995a; Smart *et al.*, 1995b; Liu *et al.*, 1997; Oka *et al.*, 1997). En el mismo sentido Pinard y colaboradores (Pinard *et al.*, 2005) han propuesto la co-localización de los L-VOCC ( $\text{Ca}_v1.2$ ) y de la CaMKII. La asociación directa de la CaMKII con los *rafts* lipídicos también ha sido sugerida (Suzuki *et al.*, 2008) y se ha propuesto que la regulación del influjo de calcio vía los L-VOCC es controlada en microdominios subcelulares específicos por mecanismos múltiples que permiten la asociación de la CaMKII y otras proteínas de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  con las subunidades del canal (Grueter *et al.*, 2008). En la misma dirección ha sido descrito que la depleción de colesterol en cardiomiocitos puede modular el nivel de fosforilación de los L-VOCC y tener así un efecto indirecto sobre la actividad de estos canales (Tsujikawa *et al.*, 2008). Por todo lo expuesto, se hace necesario profundizar en el conocimiento de los componentes proteicos de estas



uniones/microdominios de la membrana plasmática para una mejor comprensión de las funciones bioquímicas y biológicas de estos compartimentos subcelulares. Por otra parte, para conseguir una eficiencia aceptable de transfección de las CGN en cultivo es necesario realizar un tratamiento de tripsinización del cultivo (Gärtner *et al.*, 2006), y es muy cuestionable que este tratamiento no altere la estructura de los microdominios de la membrana plasmática. Por esta razón, para elucidar la composición proteica de estos microdominios en este trabajo hemos utilizado herramientas de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) alternativas.

### 1.4. FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

Puesto que el tamaño de los microdominios proteicos asociados a *rafts* lipídicos es de 10-200 nm (Pike, 2006; Duggan *et al.*, 2008), las imágenes de microscopia de fluorescencia basadas en FRET son la mejor opción como método para profundizar en el conocimiento de la organización espacial y estructural de estos microdominios en las células. Las medidas de eficiencia de FRET para el caso más simple de un par donador/aceptor permite determinar la distancia de separación entre ambos con una precisión mejor de  $\pm 1$  nm, siempre que se encuentren a una distancia inferior a  $2 \cdot R_0$  (donde  $R_0$  es la distancia a la que la eficiencia de FRET es del 50% asumiendo orientación al azar entre donador y aceptor) (Centeno y Gutierrez-Merino, 1992; Gutierrez-Merino *et al.*, 1994). Puesto que hay una amplia variedad de pares donador/aceptor disponibles con distancias de  $R_0$  entre 1 y 6 nm, en la práctica esto permite determinar distancias de separación entre donador y aceptor menores de 12 nm. Sin embargo, la situación de un solo par donador/aceptor aislado es una situación muy poco probable en una célula y menos aún en membranas biológicas (Gutierrez-Merino *et al.*, 1994). En estos casos la situación más probable es una situación de múltiples aceptores por donador y ha sido demostrado que en esta situación FRET permite determinar distancias de separación hasta aproximadamente  $4 \cdot R_0$  (Gutierrez-Merino, 1981a; Gutierrez-Merino, 1981b; Gutierrez-Merino *et al.*, 1994). Por tanto, con un par donador/aceptor que presente un valor de  $R_0$  de 6 nm en el caso de múltiples aceptores por donador el intervalo de distancia FRET se expande hasta aproximadamente 24 nm. Una ventaja adicional de la situación de múltiples aceptores por donador es que se minimiza la incertidumbre en la distancia entre

donador y aceptor calculada a partir de las medidas de FRET, ya que la suposición de orientación al azar entre donador y aceptor se encuentra plenamente justificada en este caso (Gutierrez-Merino, 1981a; Gutierrez-Merino, 1981b; Gutierrez-Merino *et al.*, 1994).

El uso de FRET con anticuerpos fluorescentes para proteínas específicas tiene un valor potencial muy elevado para la identificación de las proteínas que se encuentran en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos. En estos casos el intervalo de distancias de FRET debe tener en consideración dos factores: (1) las dimensiones de un complejo formado por un par de anticuerpos tipo IgG (primario+secundario), un paralelepípedo de aproximadamente 25 nm x 25 nm x 10 nm, y (2) la libertad de rotación de las proteínas de membrana y de los anticuerpos asociados a las mismas. Por estas razones, el intervalo de distancias entre dos proteínas de un microdominio que pueden producir una eficiencia de FRET detectable experimentalmente se incrementa hasta 50 nm, si una de las proteínas se marca con un par de anticuerpos (primario+secundario fluorescente) y la otra con un ligando fluorescente (donador o aceptor FRET del secundario fluorescente), y hasta 100 nm, si cada una de las dos proteínas se marca con un par de anticuerpos (primario+secundario fluorescente) que formen un par FRET. Por tanto, considerando las dimensiones propuestas para los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos, 100-300 nm (Pike, 2006; Duggan *et al.*, 2008), esta estrategia es particularmente apropiada para una primera aproximación a la resolución estructural de la composición proteica de estos microdominios y es la que se ha seguido en esta Tesis Doctoral.

## ***2. Objetivos***



En esta Tesis Doctoral se ha planteado y cuestionado experimentalmente la hipótesis de la compartimentación de los principales sistemas de entrada y salida de calcio de la membrana plasmática y de los sistemas generadores de especies reactivas del oxígeno (ROS) en los sub-microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de neuronas y su relevancia para la formación de microcompartimentos transitorios de calcio elevado cerca de la membrana plasmática en neuronas y en las alteraciones de la homeostasis del calcio citosólico por ROS. Para tal fin se han definido los siguientes objetivos concretos:

- Desde una perspectiva metodológica desarrollar herramientas de imagen utilizando FRET con anticuerpos secundarios fluorescentes contra los anticuerpos primarios para las proteínas de interés.
- Verificar la posible presencia del L-VOCC, del NMDAr, de la PMCA, del NCX, de la nNOS y de la  $Cb_5R$  en los submicrodominios asociados a *rafts* lipídicos y la proximidad o intervalo de la distancia de separación entre ellos dentro de estos microdominios.
- Definir los sistemas de transporte de calcio de membrana plasmática más relevantes en el control de la homeostasis de calcio intracelular en las neuronas granulares de cerebelo y estudiar los efectos de la disrupción de los *rafts* lipídicos por depleción de colesterol en la homeostasis de calcio intracelular.
- Identificar las proteínas quinasas de mayor relevancia para la regulación de la homeostasis del calcio citosólico por los sistemas de transporte de calcio identificados en los sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos de la membrana plasmática en las neuronas granulares del cerebelo en cultivo.

## **2. Objetivos**

- Analizar la estabilidad de la composición proteica de estos submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos tras exposición de las neuronas granulares del cerebelo a estrés oxidativo y a agentes moduladores de la estructura de los microfilamentos de actina asociados a los mismos.

### ***3. Materiales y métodos***





### 3.1. Equipos científicos y reactivos utilizados

#### 3.1.1. Equipos científicos

- Campana Nüve LN 090
- Incubadora de CO<sub>2</sub> Heal Force - HF 90
- Microcentrífuga Eppendorf 5415R
- Ultracentrífuga Beckman Coulter Optima™ L-90K
- Espectrofotómetro PG Instruments T70
- Espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer 650-40
- Microscopio de epifluorescencia Nikon Diaphot 300
- Cámara digital CCD del microscopio Hamamatsu HiSCA C6790-81
- Cámara digital CCD del microscopio Hamamatsu ORCA-R<sup>2</sup>
- Rueda de filtros del microscopio Lambda 10-12
- Sistema de electroforesis y *western blotting* BIO-RAD

#### 3.1.2. Productos químicos y reactivos

Todos los anticuerpos fueron utilizados con una dilución dentro del intervalo recomendado en las hojas técnicas del producto. Los anticuerpos primarios utilizados están descritos en la tabla 3.1, así como los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos están descritos en la tabla 3.2.

Reactivos de Inmunoprecipitación: Matriz ExactaCruz A con el reactivo de revelado para *western blotting* HRP correspondiente (sc-45038) y Matriz ExactaCruz D con el reactivo de revelado para *western blotting* HRP correspondiente (sc-45041) suministrados por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Los reactivos de *western blotting* anti-cabra IgG horseradish peroxidasa, anti-conejo IgG horseradish peroxidase y SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate fueron adquiridos de Pierce (Rockford, IL, USA).

Los reactivos para medir Ca<sup>2+</sup> *in vitro* fura-2 acetoximetil ester (fura-2 AM) y pluronic fueron adquiridos de Biotium (San Francisco, CA, USA).

Todos los demás reactivos y productos químicos fueron suministrados por Sigma-Aldrich ó Roche-Merck (Darmstadt, Alemania).

**Tabla 3.1** – Descripción informativa de los anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de *western blotting*, inmunocitoquímica y inmunoprecipitación así como la referencia de la respectiva casa comercial.

Anticuerpo	Producido en:	Casa Comercial	Referencia
CaMKII	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-9035
Caveolina-1	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-894
Caveolina-2	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-7942
Caveolina-2	cabra	Santa Cruz, CA, USA	sc-1858
Cb <sub>5</sub> R=DIA-1	conejo	ProteinTech Group, Chicago, IL, USA	10894-1-AP
Flotillina-1	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-25506
Flotillina-1	cabra	Santa Cruz, CA, USA	sc-16640
H-Ras	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-520
L-VOCC	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-25686
L-VOCC	cabra	Santa Cruz, CA, USA	sc-32070
NCX	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-32881
NCX1	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-30304-R
NMDAr	cabra	Santa Cruz, CA, USA	sc-1468
nNOS	ratón	Santa Cruz, CA, USA	sc-5302
PKA	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-28892
PMCA	conejo	Santa Cruz, CA, USA	sc-28765
PMCA1/4	ratón	Santa Cruz, CA, USA	sc-20028

**Tabla 3.2** – Descripción informativa de los anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica así como la referencia de la respectiva casa comercial.

Anticuerpos secundarios	Casa Comercial	Referencia
anti-conejo IgG-Alexa488	Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)	A11008
anti-cabra IgG-Alexa488	Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)	A11055
anti-ratón IgG-Alexa488	Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)	A11001
anti-conejo IgG-Cy3	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	C2306
anti-cabra IgG-Cy3	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	C2821
anti-ratón IgG-Cy3	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	C2181

### 3.2. Material biológico

Para los cultivos de células granulares de cerebelo se han utilizado ratas Wistar de 7 días de edad con un peso de 20-25 g. Las ratas fueron suministradas y mantenidas por el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura, donde se alimentaron con agua y pienso, a una temperatura constante de 22-23 °C y una humedad que osciló entre el 60 y el 80 %.

### 3.3. Tampones y disoluciones utilizadas

La composición del tampón MLocke 5 (pH 7,4 a los 37 °C) utilizado en todo el trabajo experimental con las células granulares de cerebelo es: 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM N-[tris (hidroximetil) metil] glicina, 5 mM glucosa, 2,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 134 mM NaCl y 5 mM KCl.

La composición del tampón MLocke 25 (pH 7,4 a los 37 °C) utilizado en todo el trabajo experimental con las células granulares de cerebelo es: 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM N-[tris (hidroximetil) metil] glicina, 5 mM glucosa, 2,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 134 mM NaCl y 25 mM KCl.

La composición del tampón de muestra utilizado en SDS-PAGE en todo el trabajo experimental es: 26,6 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,86 % SDS, 0,43% (v/v) β-mercaptoetanol, 0,014 % azul de bromofenol preparado en 20 mM Tris pH 7 y 37,3 % glicerol.

La composición del tampón de electroforesis utilizado en SDS-PAGE en todo el trabajo experimental es: 25 mM Tris, 190 mM Glicina, 10 % SDS (pH 8,3).

La composición del tampón de transferencia utilizado en *western blotting* en todo el trabajo experimental es: 25 mM Tris, 190 mM Glicina, 0,1 % SDS, 20 % Metanol (pH 8,3).

La composición del tampón fosfato salino (PBS) es: 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl y 27 mM KCl (pH 7).

La composición del tampón tris salino (TBS) es: Tris 20 mM y NaCl 150 mM (pH 7,4).

### 3.4. Cuantificación y determinación de proteínas

#### 3.4.1. Cuantificación de proteína en las muestras

La cuantificación de proteína en las diferentes muestras se hizo utilizando el Coomassie Plus Bradford Assay (Thermo Scientific) y BSA como patrón. Una vez ligada la proteína al colorante, este pasa de color rojo a un color azul que puede ser cuantificado a 595 nm. Para cuantificar la proteína en las muestras se ha realizado una curva patrón con diferentes cantidades de BSA: 1, 2, 4, 6, 8 µg diluidas en el tampón en el que se diluye la muestra con un volumen de 25 µl. Posteriormente se añade 500 µl de Coomassie y pasados 5 minutos se mide en el espectrofotómetro. La concentración de proteína se ha calculado por interpolación en la curva patrón obtenida con BSA.

#### 3.4.2. SDS-PAGE y *Western blotting*

Se ha realizado SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) con diferentes concentraciones de acrilamida en los geles: 7,5, 10,4 y 12,5 %, dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. A todas las muestras cargadas en los geles se ha añadido el tampón de muestra siguiente (descrito en la sección 3.3), 125 mM urea por µg proteína y 0,3 % saponina. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,2 ó 0,4 µm de tamaño de poro (Trans-Blot Transfer Medium, BioRad). Después de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con 5 % (m/v) leche en PBS, seguida de incubación a temperatura ambiente durante 1h. Las membranas se han lavado 3 veces con PBS suplementado con 0,05 % de Tween 20 (PBST). Las proteínas se detectaron incubando la membrana con el anticuerpo primario específico (dilución 1:100) en PBST durante toda la noche. Después se lavó 6 veces con PBST y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario IgG conjugado con HR peroxidasa en PBST a temperatura ambiente durante 1h. Cada anticuerpo secundario fue utilizado con una dilución diferente ajustada empíricamente para tener una señal de revelado aceptable en 2-3 minutos: anti-conejo – 1:8.000, anti-ratón – 1:50.000 y anti-cabra 1:500.000. A continuación, se lavaron las membranas 6 veces con PBST seguido por una incubación de 3 minutos con el revelador quimioluminiscente Super-Signal West Dura Substrate

(Pierce). Los *western blotting* se han montado en una “cassette” con una película de autorradiografía Amersham Hyperfilm MP (GE Healthcare, UK) y a continuación se reveló la película utilizando el revelador (p7042) y el fijador (p7167) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## 3.5. Preparación de las neuronas granulares del cerebelo (CGN)

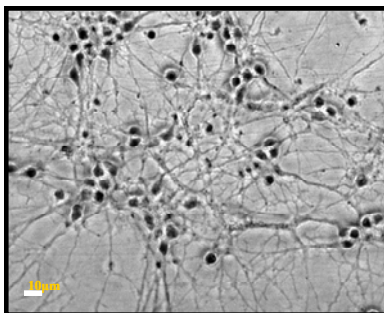
### 3.5.1. Cultivos de las neuronas granulares del cerebelo

Las CGN fueron obtenidas de cerebelos de ratas Wistar de 7 días de edad disociados como se ha descrito previamente en (Martin-Romero *et al.*, 2002b; Samhan-Arias *et al.*, 2004; Samhan-Arias *et al.*, 2009; Martin-Romero *et al.*, 2000; Marques-da-Silva *et al.*, 2010). Las células fueron sembradas con una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células/placa en medio modificado DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, 5 mM de glucosa, 19,63 mM de KCl, 3,7 ng/mL de insulina, 7  $\mu$ M 4-aminobenzoico, 50 U/mL penicilina, 25 U/mL streptomycin, 0,91mM piruvato y 2mM glutamina en placas de 35 mm y en placas de 24 pocillos previamente tratadas con poli-D-lisina (50 mg/L).

El cultivo fue mantenido a 37 °C en una atmosfera húmeda compuesta por 95 % de aire y un 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 48 h se añadió 10  $\mu$ M de citosina- $\beta$ -D-arabino-furanósido (Ara-C) al medio de cultivo para evitar la replicación de las células no neuronales. Siete días después de colocadas en las placas, el medio de cultivo fue sustituido por un medio DMEM sin suero: el medio F12 suplementado con 12,5 mM glucosa, 20,82 mM KCl, 5  $\mu$ g/mL insulina, 0,1 mg/mL apo-transferina, 20 nM progesterona, 50 U/mLpenicilina, 25 U/mL streptomycin, 0,1 mg/mL piruvato y 2mM L-glutamina.

En la figura 3.1 se puede observar una imagen de contraste de fase de las CGN al octavo día *in vitro* (DIV 8) obtenida con la cámara Hamamatsu CCD conectada al microscopio de epifluorescencia Nikon Diaphot 300, con una resolución de binning mode de 2x2. Las imágenes se adquirieron con un filtro de excitación de 470 nm. Los objetivos utilizados en este estudio fueron: Plan ELWD 20 $\times$  y CF N Plan LWD 100 $\times$ el. La imagen muestra que tanto los límites del soma como la enorme cantidad de

conexiones entre estas células son bien visibles, además se observa que no hay contaminación significativa de otro tipo de células ( $\leq 2\%$ ).



**Figura 3.1** – Imagen de contraste de fase (CF) representativa de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo *in vitro*. Las neuronas fueron fijadas a DIV 8 como se ha descrito anteriormente. Imagen obtenida con la cámara Hamamatsu CCD conectada al microscopio de epifluorescencia Nikon Diaphot 300.

#### 3.5.2. Medida de la viabilidad celular de las CGN

Se realizaron ensayos de viabilidad celular para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos con las neuronas granulares de cerebelo preparadas en este estudio. La viabilidad celular de las neuronas granulares de cerebelo se mide por la reducción del MTT a formazán, que es una reacción catalizada por diferentes actividades deshidrogenasa de las células viables. Se lavaron las placas con 1 ml de MLocke 25 a la temperatura ambiente y a continuación se añadió a las células 0,3 mg/ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difeniltetrazolio (MTT) disuelto en MLocke 25 y las placas de cultivo fueron mantenidas durante 15 minutos en el incubador a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Después se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) al formazán precipitado en la placa para disolverlo. La cantidad de formazán precipitado en cada ensayo se ha determinado espectofotométricamente calculando la diferencia de absorción entre 490 nm y 700 nm. Tomando el pertinente control como valor referencial de viabilidad, los valores de viabilidad en las diferentes condiciones experimentales se expresan como porcentaje del valor de dicho control.

### 3.6. Tratamientos realizados en las neuronas granulares del cerebelo

#### 3.6.1. Tratamiento de las CGN con SIN-1

Considerando que el 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) se descompone con la luz y con el aumento de la temperatura, se ha determinado experimentalmente su cinética de descomposición en nuestras condiciones experimentales utilizando un método desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Martín-Romero *et al.*, 2004b). Este método se basa en que la reacción del peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) con el NADH resulta en la formación del  $\text{NAD}^+$  y  $\bullet\text{O}_2^-$  (Kirsch y de Groot, 1999), por lo que se puede utilizar el NADH para seguir la cinética de descomposición del SIN-1 produciendo peroxinitrito en las soluciones tampón utilizadas en el tratamiento de las CGN. Este método tienen un límite de detección de inferior a  $0,1 \mu\text{M}$  de  $\text{ONOO}^-$  a pH 7,4 (Martín-Romero *et al.*, 2004b), con la ventaja de que la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$  por el peroxinitrito es equimolecular y su cinética puede ser seguida de manera continua a la longitud de onda de 340 nm. La cinética ha sido monitorizada en MLocke 25, a los  $37^\circ\text{C}$  y con una adición inicial de  $50 \mu\text{M}$  de NADH ( $[\text{NADH}]_{\text{stock}} = 25 \text{ mM}$ , preparado en 50 mM Tes/Tris, pH 7,0) y la absorbancia se registró durante 5 minutos. A continuación se añadió el SIN-1 a una concentración final en el ensayo de  $30 \mu\text{M}$ . La cinética de caída de absorbancia se registró durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ . La velocidad de descomposición del SIN-1 fue determinada utilizando el coeficiente de extinción molar del NADH:  $\Delta\text{Abs}_{340\text{ nm}} = 6,2 \text{ mD.O./nmol/ml de NADH}$ .

El SIN-1 fue preparado directamente en un eppendorf por dilución con agua MiliQ, este reactivo se protegió de la luz para evitar a su fotodescomposición y congelado a  $-80^\circ\text{C}$  inmediatamente después de su uso.

Para investigar el efecto de SIN-1 sobre las CGN el tratamiento se ha realizado al DIV 8 en las neuronas granulares de cerebelo. Para tal fin, las placas conteniendo las CGN fueron lavadas con MLocke 25 y posteriormente incubadas durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con  $0,75 \text{ mM}$  de SIN-1 preparado en MLocke 25. Transcurrido el tiempo de incubación las placas se lavaron con MLocke25 y se lisaron como se describe en la sección 3.7.1 ó se fijaron con para-formaldehído como se describe en la sección 3.8.1.

#### **3.6.2. Tratamiento de las CGN con latrunculina B**

Para testear el efecto de la latrunculina B (LA) el tratamiento se ha realizado al DIV 8 en las neuronas granulares de cerebelo, las placas conteniendo las CGN fueron lavadas con MLocke 25 y posteriormente incubadas con 5  $\mu$ M de latrunculina B preparada en MLocke 25 durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación las placas se lavaron con MLocke 25 y se lisaron como se describe en la sección 3.7.1.

#### **3.6.3. Tratamiento de las CGN con medio bajo en potasio**

Al DIV 8, con el objeto de realizar el tratamiento en las células en condiciones de bajo potasio, el medio de cultivo fue sustituido por el mismo medio DMEM sin suero descrito en la sección 3.5.1 pero disminuyendo la concentración de KCl hasta 5 mM. Las células fueron mantenidas en este medio durante 3h a 37 °C, después se lavaron las placas con MLocke 5. Las células sometidas a este tratamiento se han utilizado para lisados celulares como se describe en la sección 3.7.1.

#### **3.6.4. Tratamiento de las CGN con M $\beta$ CD y neuraminidasa**

El tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) fue realizado en las neuronas granulares de cerebelo al DIV 10. En primer lugar realizamos estudios experimentales para establecer el intervalo de concentraciones del tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina en el cual no ocurre una muerte celular significativa. Para tal fin, se realizaron incubaciones de 10-20 minutos con diferentes concentraciones de metil- $\beta$ -ciclodextrina, utilizando las siguientes concentraciones de este reactivo: 0, 2,5, 5, 10, 15, 20 y 25 mM. Las disoluciones de las diferentes concentraciones de metil- $\beta$ -ciclodextrina se prepararon por separado en tampón MLocke 25 partiendo de una disolución inicial de 0,25 M metil- $\beta$ -ciclodextrina, preparada también en MLocke 25. El tratamiento de las CGN con este reactivo se ha iniciado después de cambiar el medio de cultivo F-12 por MLocke 25, mediante la adición de la disolución de las concentraciones de metil- $\beta$ -ciclodextrina indicadas en los experimentos incluidos en las secciones de resultados. Inmediatamente después las placas se han colocado en la estufa de CO<sub>2</sub> a una



temperatura de 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación indicado en cada caso se lavó la placa con 500 µl MLocke 25 y se añadió 1 ml de Mlocke 25.

El tratamiento de las CGN con neuraminidasa se ha realizado en MLocke 25, es decir, después de quitar el medio de cultivo F-12 por MLocke 25 e incubando las células durante 1h con 0,4 U/ml de neuraminidasa en la estufa de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

## 3.7. Estudios de localización de proteínas en la membrana plasmática de las CGN

### 3.7.1. Preparación de los lisados celulares

Las CGN fueron cultivadas durante 8 días *in vitro* y lavadas con el tampón MLocke 25. A continuación, las CGN fueron resuspendidas y centrifugadas a 4 °C durante 2 minutos a 2.000 g en la microcentrífuga refrigerada Eppendorf, se resuspendieron y lisaron los precipitados celulares en 550 µl de solución tampón (25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 5 mM NaVO<sub>3</sub> y 0,25% Triton X-100, suplementado con el cocktail inhibidor de proteasas de Roche Biochemicals (COMPLETE) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C.

### 3.7.2. Preparación de los *rafts* lipídicos

Los *rafts* lipídicos fueron preparados a partir de los lisados celulares y aislados utilizando diferentes gradientes de sacarosa, siguiendo un método adaptado de los siguientes protocolos (Herreros *et al.*, 2001; Macdonald y Pike, 2005). Se ajustó la concentración de sacarosa en las muestras lisadas al 41 % antes de cargarla encima de las disoluciones de las diferentes concentraciones de sacarosa utilizadas para formar el gradiente: la de 35% y la de 16 % preparadas en 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF y 5 mM NaVO<sub>3</sub>. Para el aislamiento de los *rafts* lipídicos las muestras fueron centrifugadas a 256.000 g durante 5 h a 4 °C en la ultracentrífuga utilizando el rotor SW60. La muestra fue recogida en 10 fracciones contando desde la parte superior del tubo de centrifuga y se numeraron desde el 1 al 10.

#### 3.7.3. Determinación de la localización de las proteínas marcadoras de *rafts* lipídicos, de los sistemas de transporte de calcio, de los sistemas redox y de las proteínas quinasas en la membrana plasmática de las CGN

Con el objetivo de identificar y confirmar las fracciones de *rafts* lipídicos se analizó la presencia de las proteínas marcadoras de *rafts* lipídicos en las diferentes fracciones recolectadas tras la centrifugación en gradiente de sacarosa. Para tal fin, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y por *western blotting* utilizando tres marcadores ampliamente aceptados de los *raft* lipídicos de la membrana plasmática (H-Ras, flotillina y caveolina-1). Además de estas proteínas marcadoras de *rafts* lipídicos y con el objeto de analizar la localización de las proteínas correspondientes a los sistemas de entrada y salida de calcio así como de las proteínas redox y proteínas quinasas se han utilizado anticuerpos específicos contra cada una de estas proteínas. Así, para los sistemas de entrada de calcio se utilizaron los anticuerpos anti-LVOCC y anti-NMDAr; para los sistemas de salida de calcio fueron utilizados los anticuerpos anti-PMCA1/4 y anti-NCX1, en el caso de las proteínas redox se utilizaron los anticuerpos anti-nNOS y DIA-1 y en el caso de las proteína quinasas se utilizaron los anticuerpos anti-PKA y anti-CaMKII (tabla 3.1).

La cantidad de proteína cargada para estas muestras fue de 2 y 2,5 µg por pocillo en cada gel, dependiendo de la concentración de proteína obtenida en cada preparación de *rafts* lipídicos. Todos los demás procedimientos de SDS-PAGE y *western blotting* fueron realizados como ha sido descrito en la sección 3.4.2.

### 3.8. Estudios de FRET

#### 3.8.1. Fijación de las neuronas granulares del cerebelo

Para las medidas de FRET se utilizaron las CGN maduras al DIV 8 en placas de 24 pocillos con una densidad de 600.000 células por pocillo. Los pocillos fueron lavados con el tampón MLocke 25 para limpiar el rojo fenol que queda del medio en las placas. Después se fijaron las células con 2,5 % (m/v) para-formaldehído, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ácido etilén-glicol-bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) y 0,32 M sacarosa en tampón PBS.

#### 3.8.2. Obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia

A lo largo de todo el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral las imágenes de microscopía de fluorescencia de las CGN se adquirieron con dos cámaras de microscopia diferentes y para cada una de ellas se ajustaron los tiempos de exposición para la obtención de imágenes. Se han utilizado la cámara Hamamatsu HiSCA CCD C6790-81 y la cámara Hamamatsu CCD ORCA-R<sup>2</sup> ambas conectadas al microscopio de epifluorescencia Nikon Diaphot 300, con una resolución de binning mode de 2x2. Las imágenes se adquirieron con un filtro de excitación de 470 nm, con un espejo dichroico a 510 nm/filtro de emisión a los 520 nm (fluorescencia verde del donador) y con un espejo dichroico a 580 nm/filtro de emisión a los 590 nm (fluorescencia roja del aceptor), utilizando objetivos plan-acromáticos, siendo el más utilizado en este estudio el Plan ELWD 20×.

La intensidad de fluorescencia de las imágenes seleccionadas y de los somas seleccionados se cuantificó con el *software* Argus/Hisca de la cámara Hamamatsu CCD como se ha indicado en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Samhan-Arias *et al.*, 2006; Samhan-Arias *et al.*, 2009) y con el *software* HImage de la cámara Hamamatsu ORCA-R<sup>2</sup> (Marques-da-Silva *et al.*, 2010). Las imágenes en pseudo-color se transfirieron al formato TIFF para permitir el análisis con el *software* Image J de los histogramas de color.

Para los experimentos de FRET se utilizaron las células fijadas como se ha descrito anteriormente. Las neuronas fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora con el anticuerpo primario en PBS suplementado con 0,2 % Triton X-100 y lavadas 6 veces con PBS. Posteriormente las células se incubaron 30 minutos las células con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con el fluoróforo Alexa-488 en PBS suplementado con 0,2 % Triton X-100 y se lavaron 6 veces con PBS. Después de obtener las imágenes de microscopia de fluorescencia con el donador se incubaron las CGN con el segundo anticuerpo primario durante 1 hora a 37 °C en PBS suplementado con 0,2 % Triton X-100 y se lavaron 6 veces, obteniéndose a continuación una segunda serie de imágenes de microscopia de fluorescencia. Posteriormente se ha realizado una incubación de 30 minutos con el anticuerpo secundario fluorescente apropiado (marcado con el fluoróforo Cy3) en PBS suplementado con 0,2 % Triton X-100 y se lavaron 6 veces con PBS antes de obtener las imágenes de microscopia de fluorescencia con el par donador-aceptor.

La especificidad de los anticuerpos primarios para las proteínas seleccionadas en este estudio fue confirmada experimentalmente en todos los casos por la presencia de una banda principal con 90 % de intensidad con el peso molecular de la proteína correspondiente en el *western blotting* de lisado celular de las neuronas granulares de cerebelo, como en trabajos anteriores en nuestro laboratorio (Samhan-Arias *et al.*, 2009; Samhan-Arias *et al.*, 2012). Los anticuerpos que no tenían al menos este grado de especificidad de unión fueron descartados y no han sido utilizados en este trabajo. Antes de iniciar los experimentos de FRET se realizaron controles para confirmar que las CGN tratadas con los anticuerpos secundarios Alexa488-IgG y Cy3-IgG en ausencia de los anticuerpos primarios no presentaban una señal de fluorescencia significativa con los tiempos de exposición y otras condiciones de medida utilizadas para la determinación de FRET (<10% de la señal registrada en CGN tratadas con los anticuerpos primarios pertinentes).

#### 3.8.3. Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)

La eficiencia de FRET mide la fracción de energía de los fotones absorbidos por el donador que es transferida al aceptor (Stryer, 1978; Gutierrez-Merino *et al.*, 1984). Para un par donador/aceptor con una orientación aleatoria, la eficiencia de FRET (E) depende de distancia de separación entre donador y aceptor (r):  $E = r^{-6}/(R_0^{-6} + r^{-6})$ , donde  $R_0$  es la distancia de 50 % de eficiencia de FRET y puede ser calculado a partir de la integral de solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor (Gutierrez-Merino *et al.*, 1989; Centeno y Gutierrez-Merino, 1992; Samhan-Arias *et al.*, 2006). Los fluoróforos Alexa488 y Cy3 son un buen par donador/aceptor para experimentos de FRET, con un valor de  $R_0$  entre 5 y 6 nm (Haugland, 2005). Como la eficiencia de FRET es menor que el 2% cuando  $r = 2 \cdot R_0$ , la distancia máxima a la que FRET es detectable con cierto grado de fiabilidad experimental entre un único par Alexa488 y Cy3 es menor que 12 nm.

Cada anticuerpo secundario está marcado con más de 1 mol de Cy3 por mol de anticuerpo, por esta razón cuando se utilizan anticuerpos que forman pares donador-aceptor de FRET siempre se da una situación de FRET de un donador hacia múltiples aceptores. En el caso de microdominios de proteínas en membranas biológicas, además es muy probable la presencia de más de una molécula aceptora alrededor de las

proteínas marcadas con el donador. Las ventajas de una situación de FRET como esta es que hay un error mínimo cuando se asume que hay orientación aleatoria entre el donador y el aceptor y la distancia de separación máxima para que FRET sea experimentalmente detectable aumenta cerca de dos veces (Gutierrez-Merino, 1981b; Gutierrez-Merino *et al.*, 1994).

La contribución de la intensidad de fluorescencia de la cola del pico de emisión del donador en la fluorescencia roja (FR) en las CGN con doble tinción (Alexa488: donador; Cy3: aceptor) es menor que el 20 % en todos los resultados experimentales mostrados en este estudio. Esta contribución fue corregida adquiriendo las imágenes de fluorescencia verde [FV(Alexa488)] y roja [FR(Alexa488)] de las CGN teñidas sólo con el anticuerpo primario y su correspondiente Alexa488 IgG, y después se ha calculado la señal de la ratio de de intensidades de fluorescencia roja/verde,  $R(\text{Alexa488})$ . Con este valor se calculó la contribución de la señal de fluorescencia roja del Alexa488 en las CGN doblemente teñidas:  $\text{FR}(\text{Alexa488}) = \text{FV}(\text{Alexa488}) \cdot R(\text{Alexa488})$  y por ultimo hemos restado estos valores de  $\text{FR}(\text{Alexa488})$  de la FR total medida en CGN doblemente teñidas con Alexa488 y Cy3.

### 3.9. Estudios de inmunoprecipitación

Para obtener el complejo anticuerpo-matriz se ha añadido en un eppendorf 5 µg del anticuerpo con el cual se desea precipitar la muestra, 50 µl de la matriz con el mismo origen del anticuerpo y 500 µl TBS. El complejo fue incubado durante 1h en un rotor de tubos con agitación continua. La matriz fue precipitada por centrifugación durante 30 segundos a 4 °C en la máxima velocidad permitida por la microcentrifuga Eppendorf refrigerada 5415R (16.100 g). Se elimina el sobrenadante y se lava la matriz precipitada 3 veces con TBS, repitiendo el paso de máxima velocidad de centrifugación para una mejor eliminación del sobrenadante.

Para estos experimentos se han preparado los lisados celulares como ha sido descrito en la sección 3.7.1. En un eppendorf se añaden 2 mg de proteína de los lisados de neuronas granulares del cerebelo y 40 µl de la matriz para realizar un lavado previo y se agitó durante 30 minutos en un rotor de tubos. La matriz se precipitó por centrifugación durante 30 segundos a 16.100 g y a 4 °C en la microcentrifuga Eppendorf 5415R. Evitando resuspender el precipitado se retiró el sobrenadante y se depositó en

un tubo eppendorf limpio, eliminando el precipitado donde está la matriz. A continuación se le añade 25 mM M $\beta$ CD, se homogeneiza y se traslada para el tubo con el complejo precipitado anticuerpo-matriz obtenido en el paso anterior (párrafo anterior). El tubo se incuba 1 hora con agitación a la temperatura ambiente en el rotor de tubos. A continuación se centrifugó a 4 °C durante 30 segundos a 16.100 g en la microcentrifuga Eppendorf 5415R con el objeto de precipitar la matriz y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. La matriz fue lavada 4 veces con TBS, repitiendo el paso de centrifugación a 16.100 g a 4°C para una mejor eliminación de restos del sobrenadante. Al precipitado final se añadió 7  $\mu$ l de tampón de muestra y la urea y la saponina (como ha sido descrito en la sección 3.4.2.), se hirvió durante 5 minutos y las muestras fueron depositadas en el gel SDS-PAGE preparado previamente. Posteriormente, se realizó la electroforesis como se ha descrito previamente en la sección 3.4.2. y la transferencia como se ha descrito previamente para la realización de *western blotting*: bloqueo, incubación con los anticuerpos primario y secundario y revelado por quimioluminiscencia.

### 3.10. Determinación de la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre intracelular en las CGN *in vitro*

#### 3.10.1. Carga de las CGN con fura-2 AM

Para determinar la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), se utilizó la sonda fluorescente fura-2 acetoximetil éster (fura-2 AM), ya que el derivado esterificado acetoximetil éster (AM) permite que la sonda atraviese con facilidad la membrana plasmática y se hidrolice rápidamente por las esterasas intracelulares. La forma esterificada de la sonda no es soluble en agua y por eso se disolvió en DMSO a la concentración de 1 mM y se almacenó en la oscuridad a -20 °C.

La carga del fura-2 AM en las células se ha realizado procediendo a una pre-incubación de 45 a 60 minutos de las CGN con 5  $\mu$ M de fura-2 AM y con 0,025 % Pluronic-F127 a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. El Pluronic-F127 se ha utilizado para facilitar la dispersión de la sonda, evitando artefactos experimentales derivados de la formación de microgotículas de la misma.

## 3.10.2. Obtención de las imágenes de microscopía de fluorescencia

Una vez cargadas las células con fura-2 AM, las CGN se lavaron con 1 ml de tampón MLocke 25. La obtención de las imágenes de microscopía de fluorescencia se realizó como ha sido descrito en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Gutiérrez-Martín Y. *et al.*, 2005; García-Bereguiaín *et al.*, 2008). La placa fue colocada en un soporte de control termostatzado a 37 °C (Warner Instrument Co., Hamden, CT, USA) insertado en el microscopio invertido Nikon Diaphot 300 equipado con un accesorio de epifluorescencia y una rueda de filtros de excitación, con una resolución de “*binning mode*” de 2x2. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de las CGN se adquirieron con una cámara ORCA-*R*<sup>2</sup> y el controlador de la rueda de filtros Lambda 10-2. Las imágenes fueron analizadas con el *software* HImage de la cámara ORCA-*R*<sup>2</sup>. Considerando que el fura-2 AM presenta un espectro de excitación con dos máximos situados a 340 y 380 nm, donde la primera longitud de onda sirve para monitorizar la concentración del complejo fura-2-Ca<sup>2+</sup>, mientras que la segunda corresponde al fura-2 libre en el medio, se han utilizado los filtros de excitación de 340 nm y 380 nm, con un espejo dicróico a 510 nm y un filtro de emisión a los 520 nm. Para determinar la concentración intracelular de calcio en las neuronas se han utilizado las imágenes de ratio de intensidades de fluorescencia (340/380) obtenidas y la concentración de calcio fue calculada con la siguiente ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \{(R - R_{min})/(R_{m\acute{a}x} - R)\} \cdot \beta$$

Donde R es el valor promedio de la ratio calculada de la fluorescencia (340/380) y R<sub>máx</sub> y R<sub>min</sub> son los valores de ratio (340/380) para el fura-2 saturado por calcio y para fura-2 libre en las CGN precargadas con fura-2 AM, respectivamente. El parámetro β representa el valor medio de la ratio de intensidades de fluorescencia entre el fura-2 libre y el fura-2 unido a calcio a una longitud de onda de 380 nm. La constante de disociación (K<sub>d</sub>) de esta sonda, para Ca<sup>2+</sup> es de 225 nM, lo que permite con esta sonda determinar valores de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, desde 20-30 nM hasta 0,5-1 μM.

#### 3.10.3. Cambios en la concentración del calcio intracelular en las CGN *in vitro* en presencia de L-glutamato, nifedipina, nimodipina y otras dihidropiridinas fluorescentes

Para evaluar el efecto del L-glutamato y de la nifedipina o nimodipina sobre la concentración del calcio intracelular de las CGN y para validar el uso de dos sondas fluorescentes derivadas de la dihidropiridina (DHP), DM-Bodipy DHP y ST-Bodipy DHP, que se ligan a los canales de calcio tipo L activados por voltaje (L-VOCC) en las CGN *in vitro*, se ha estudiado el efecto de estas sondas en la concentración del calcio intracelular. Las neuronas se han incubado con fura-2 AM, se han lavado posteriormente con MLocke 25 y se han obtenido las imágenes de ratio de intensidades de fluorescencia a 340/380 como se ha descrito en la sección anterior. El protocolo experimental básico seguido ha sido el siguiente: se registraron imágenes de ratio de intensidades de fluorescencia 340/380 durante algunos minutos y a continuación se añadió 100  $\mu$ M de L-glutamato o 1  $\mu$ M de nifedipina o de nimodipina o diferentes concentraciones de los derivados fluorescentes Bodipy-DHP, almacenando imágenes a cortos intervalos de tiempo hasta alcanzar la estabilidad de la señal de ratio de intensidades de fluorescencia (340/380) en el soma de las CGN. En el caso del DM-Bodipy DHP y del ST-Bodipy DHP se utilizaron diferentes concentraciones para determinar el intervalo de concentraciones a utilizar de estas sondas fluorescentes.

#### 3.10.4. Tratamiento de las CGN *in vitro* con M $\beta$ CD, MK-801 y APV en los experimentos de medida de la concentración del calcio intracelular.

Cuando se realizó el tratamiento con la M $\beta$ CD este reactivo fue añadido en la placa y se registraron imágenes de ratio de intensidades de fluorescencia 340/380 durante algunos minutos antes de la adición de L-glutamato, nifedipina o nimodipina. El mismo protocolo experimental se ha utilizado para estudiar el efecto de [(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino maleato] MK-801 y de [(2R)-amino-5-phosphonopentanoate] APV sobre la respuesta de la concentración del calcio libre intracelular a la adición del L-glutamato.



**3.10.5. Efecto de la M $\beta$ CD y de la neuraminidasa en la respuesta de la concentración del calcio libre intracelular a cambios de la concentración del potasio en el medio extracelular.**

Para estudiar el efecto del tratamiento con M $\beta$ CD y neuraminidasa en la disminución del calcio citosólico provocada por la disminución de potasio en el medio extracelular se han incubado las placas 1h con el fura-2 AM a 37 °C y en atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> para el caso de la M $\beta$ CD o incubando el fura-2 AM de simultánea con 0,4 U/ml de neuraminidasa a 37 °C y en atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras finalizar la incubación se hizo un lavado con MLocke 25 antes de poner la placa Petri en el soporte termostatizado del microscopio. Tras registrar la ratio 340/380 en la situación control durante 10 minutos se ha cambiado el medio de las CGN a MLocke 5, y la ratio 340/380 se ha registrado también después de la disminución del potasio extracelular a una concentración de 5 mM. En el caso de la M $\beta$ CD, este agente se añadió inmediatamente después del cambio de medio a MLocke 5, registrándose a continuación la cinética de la respuesta de la ratio 340/380.

Para estudiar el efecto del tratamiento con M $\beta$ CD sobre la elevación de la concentración del calcio libre intracelular por la despolarización parcial de la membrana plasmática de las CGN causada por el incremento de la concentración de potasio en el medio extracelular, estas neuronas fueron sometidas al tratamiento con bajo potasio con dos tiempos de incubación con el tampón MLocke 5, uno de 50 minutos y otro de 3 horas, en ambos casos a 37 °C y en atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>. En el caso de 50 minutos esta incubación fue realizada después de la incubación con el fura-2 AM y de un lavado previo con MLocke 5. Para la situación de 3 horas de incubación las células fueron primeramente incubadas con el MLocke 5 y al inicio de la tercera hora de incubación se adicionó el fura-2 AM. Una vez finalizada la incubación se hizo un lavado con MLocke 5 antes de poner la placa Petri en el soporte termostatizado del microscopio. Tras registrar la ratio 340/380 en la situación de bajo potasio durante 10 minutos se añadió a la placa 20 mM KCl para alcanzar una concentración final de 25 mM de potasio en el medio extracelular y se han adquirido imágenes de fluorescencia a intervalos cortos hasta que la ratio de intensidad de fluorescencia en el soma neuronal se estabiliza. La M $\beta$ CD fue añadida junto con el KCl y, subsiguientemente, se procedió a la adquisición de imágenes de ratio de intensidad de fluorescencia como se ha indicado previamente.

**3.10.6. Tratamiento de las CGN *in vitro* con inhibidores específicos de diferentes proteínas quinasas en los experimentos de medida de la respuesta de la concentración del calcio intracelular al L-glutamato y nifedipina.**

El tratamiento con inhibidores de las proteínas quinasas se realizó añadiendo estos moduladores en la placa después de tener una señal de ratio de intensidades de fluorescencia (340/380) estable de las neuronas granulares de cerebelo *in vitro* previamente incubadas con fura-2 AM y lavadas con MLocke 25. Tras la adición de los inhibidores de las proteínas quinasas, se registraron las imágenes de ratio de intensidades de fluorescencia 340/380 hasta obtener una vez más la estabilidad de la señal antes de la adición de L-glutamato o nifedipina. Las proteínas quinasas testeadas en este trabajo de Tesis Doctoral han sido la PKA, la PKC y la CaMKII.

**3.10.7. Efecto de inhibidores de proteínas quinasas en la respuesta de la concentración del calcio libre intracelular a cambios de la concentración del potasio en el medio extracelular.**

Para estudiar el efecto del tratamiento con inhibidores específicos de la PKA y de la CaMKII sobre la elevación de la concentración del calcio libre intracelular por la despolarización parcial de la membrana plasmática de las CGN causada por el incremento de la concentración de potasio en el medio extracelular, estas neuronas fueron sometidas a una incubación con el fura-2 AM durante 1h a 37 °C y en atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub> y posteriormente se hizo un lavado con tampón MLocke 5. Para el tratamiento con bajo potasio se incubaron las CGN en MLocke 5 durante 50 minutos a 37 °C y en atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>. En los últimos minutos de incubación con MLocke 5 se añadió: 1) H-89 (un inhibidor de la PKA) o el correspondiente volumen del solvente aplicado con el inhibidor (DMSO); 2) KN-93 (un inhibidor de la CaMKII) o el correspondiente volumen control del solvente aplicado con el inhibidor (H<sub>2</sub>O). Tras finalizar la incubación se colocó la placa Petri en el soporte termostatzado del microscopio. Una vez registrada la ratio 340/380 en la situación de bajo potasio durante 10 minutos se añadió a la placa 20 mM KCl para alcanzar una concentración final de 25 mM de potasio en el medio extracelular y se han adquirido imágenes de fluorescencia a intervalos cortos hasta que la ratio de intensidad de fluorescencia en el soma neuronal alcanza un nuevo valor estable.

#### 3.10.8. Tratamiento de las CGN *in vitro* con SIN-1 y jasplakinolide en los experimentos de medida de la concentración del calcio intracelular en respuesta a la aplicación de la nifedipina.

Se adquirieron imágenes de ratio 340/380 de las neuronas granulares de cerebelo *in vitro* previamente incubadas con fura-2 AM y lavadas con MLocke 25. El tratamiento con SIN-1 se realizó añadiendo este agente oxidante directamente en la placa después de tener una señal de ratio de intensidades de fluorescencia (340/380) estable y se registraron imágenes de ratio de intensidades de fluorescencia 340/380 hasta alcanzar la estabilización de la señal antes de la adición de nifedipina. A continuación, se adicionó la nifedipina al medio de cultivo y se registró la cinética de evolución de la concentración del calcio intracelular hasta nueva estabilización de señal de la ratio 340/380. El mismo procedimiento se realizó en la situación de pre-incubación con jasplakinolide durante 30 minutos a 37 °C y en atmósfera del 5 % de CO<sub>2</sub>.

#### 3.11. Cuantificación del colesterol

La cuantificación del colesterol en las fracciones de *rafts* lipídicos y en los lisados celulares tratados con M $\beta$ CD se efectuó empleando Amplex Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina), una sonda fluorescente con elevada sensibilidad y especificidad para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El Amplex Red adquiere color cuando reacciona con el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en una reacción de estequiometría de 1:1 produciendo la resorufina que es altamente fluorescente (excitación/emisión máxima=570/585 nm). Así se realizó una curva de calibrado a 37 °C con adiciones consecutivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la cubeta. La composición del medio de ensayo utilizado (pH 7,0) es la siguiente: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA en presencia de 50  $\mu$ M Amplex Red y 0,2 U/ml de HRP. La valoración del colesterol en las muestras se realizó añadiendo 1 U/ml de colesterol oxidasa que oxida el colesterol presente en las fracciones para formar 4-colestenona y peróxido de hidrógeno en una reacción equimolecular. La fluorescencia de la resorufina se monitorizó con un fluorímetro Perkin-Elmer modelo 650-40 funcionando en *ratio mode*, se fijaron las longitudes de onda de excitación y emisión a 530 y 590 nm, respectivamente, con rendijas excitación y de emisión de 10 nm. La fluorescencia fue registrada durante una hora y treinta minutos hasta alcanzar un valor estable de

fluorescencia. Las unidades de fluorescencia fueron convertidas a nmoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando la recta de calibrado obtenida anteriormente con la adición de cantidades conocidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### **3.12. Análisis estadístico**

Todos los resultados mostrados son el promedio y desviación estándar (SD) de los resultados obtenidos con medidas de duplicados experimentales utilizando al menos tres preparaciones de CGN diferentes ( $n \geq 6$ ). El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test no-paramétrico de Mann-Whitney. Las diferencias han sido consideradas significativas cuando  $p < 0,05$ .

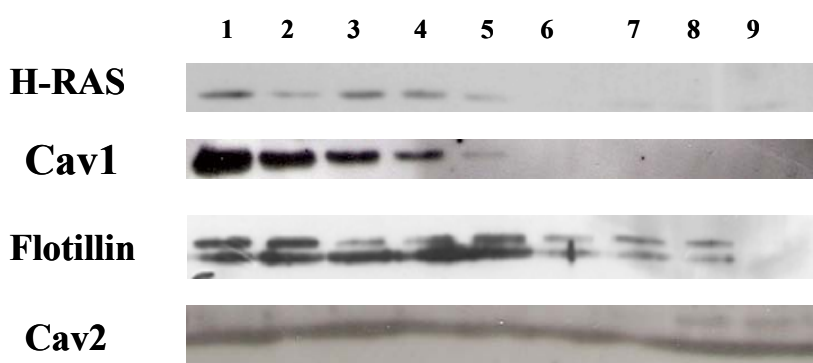
## ***4. Resultados***



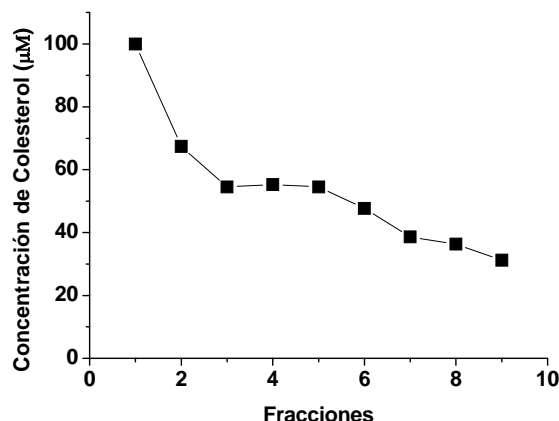
#### 4.1. Localización de los principales sistemas de entrada y de salida de calcio en microdominios proteicos asociados a los *rafts* lipídicos de las neuronas granulares de cerebelo.

##### 4.1.1. Las preparaciones de *rafts* lipídicos están enriquecidas en sistemas de transporte relevantes para la homeostasis del calcio citosólico y también en sistemas redox que generan especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).

Los fragmentos de membrana preparados a partir de lisados celulares de neuronas granulares de cerebelo fueron fraccionados utilizando gradientes de densidad de sacarosa como se ha indicado en el apartado de “Materiales y métodos” (sección 3.7.1. y 3.7.2). Los análisis por *western blotting* de las fracciones revelaron que los marcadores típicos de *rafts* lipídicos como el H-Ras, la flotilina, la caveolina-1 y la caveolina-2 están ampliamente enriquecidos en las fracciones 1-5 (Fig. 4.1.1). Adicionalmente, las fracciones 1-5 son también fracciones muy enriquecidas en colesterol (Fig. 4.1.2), de acuerdo con lo esperado para las preparaciones de *rafts* lipídicos. Debe notarse que la caveolina-2 tiene una distribución más difusa entre las diferentes fracciones del gradiente de densidad, lo que es consistente con su presencia no sólo en los *rafts* lipídicos sino también en membranas de la vía de endocitosis (Shmuel *et al.*, 2007).



**Figura 4.1.1** – Determinación por *western blotting* de las fracciones de membrana plasmática de CGN correspondiente a *rafts* lipídicos (fracciones 1-5) mediante el uso de marcadores típicos de *rafts* lipídicos: H-Ras (21/29 kDa), flotilina (45 kDa), caveolina-1 (22 kDa) y caveolina-2 (25 kDa). En los geles se cargó la misma cantidad de proteína por fracción.



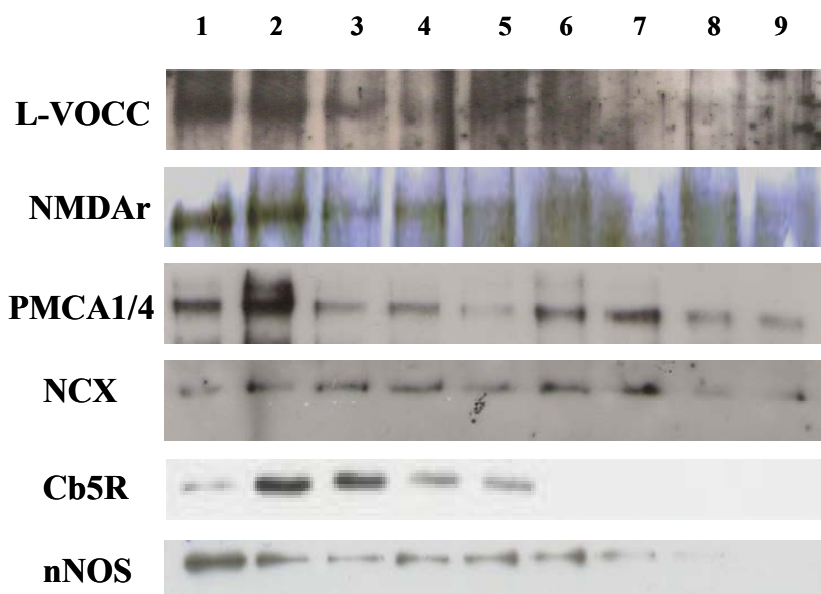
**Figura 4.1.2** – Las fracciones de *rafts* lipídicos (1-5) están enriquecidas en colesterol. El contenido en colesterol se midió mediante el uso de un método en el que se utiliza Amplex Red acoplado a colesterol oxidasa, tal y como se describe en el capítulo 3.11 de “Materiales y métodos”.

Una vez contrastadas y validadas las preparaciones de *rafts* lipídicos de las CGN (fracciones 1-5 del gradiente de densidad de sacarosa) procedimos a cuestionar la posible presencia en los mismos de los principales sistemas de transporte de calcio de la membrana plasmática de las CGN implicados en el control de la homeostasis del calcio citosólico de estas neuronas. Como se muestra en la figura 4.1.3, las fracciones de *rafts* lipídicos están muy enriquecidas en L-VOCC, NMDAr, PMCA y NCX. En otros trabajos de nuestro laboratorio hemos demostrado la presencia de la  $Cb_5R$ , una proteína redox que está implicada en la sobreproducción de ROS durante una etapa temprana de la apoptosis de las CGN, en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática (Samhan-Arias *et al.*, 2009; Samhan-Arias *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos han permitido confirmar este punto y además que la nNOS se encuentra también enriquecida en los *rafts* lipídicos aislados de CGN (Fig. 4.1.3).

Por consiguiente, estos resultados ponen de manifiesto la fuerte asociación a los microdominios de *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de CGN de los principales sistemas de transporte de calcio responsables del control de la homeostasis del calcio citosólico neuronal, y de las principales proteínas redox responsables de la producción de ROS. Hemos utilizado una aproximación experimental alternativa, imágenes de FRET de las células maduras fijadas con el objeto de confirmar estas conclusiones. Además, las imágenes de FRET nos permitieron por una parte evaluar



experimentalmente la magnitud de la partición de estas proteínas en microdominios de tamaño menor de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro (submicrodominios) asociados a los *rafts* lipídicos y por otra parte estudiar la proximidad relativa entre estas proteínas dentro de estos submicrodominios.



**Figura 4.1.3** – Presencia de las proteínas L-VOCC, NMDAr, PMCA, NCX,  $Cb_5R$  y nNOS en los *rafts* lipídicos. Los L-VOCC (164/190 kDa), el NMDAr (177 kDa), la PMCA (129-140 kDa), el NCX (67 kDa), la  $Cb_5R$  (33 kDa) y la nNOS (155 kDa), están fuertemente enriquecidos en los *rafts* lipídicos (fracción 1-5). El porcentaje total de cada proteína en las fracciones 1-5 es de 85 % para los L-VOCC, 94 % para el NMDAr, 72 % para la PMCA, 64 % para el NCX, 100 % para la  $Cb_5R$  y 89 % para la nNOS. En los geles se cargó la misma cantidad de proteína por fracción.

#### 4.1.2. Optimización de las condiciones experimentales en microscopía de fluorescencia para demostrar la existencia de FRET entre pares seleccionados y cuantificar la intensidad de FRET con el sistema de análisis de imagen acoplado al microscopio de fluorescencia.

Para la adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia se han seleccionado campos con una densidad celular similar, sin grandes agregados neuronales o gránulos, como en trabajos previos de nuestro laboratorio (Samhan-Arias *et al.*, 2006; Samhan-Arias *et al.*, 2009). Antes de proceder a la adquisición de las imágenes de microscopía de fluorescencia con los pares de FRET incluidos en este trabajo de Tesis Doctoral se optimizaron las condiciones de tratamiento de tinción de las

CGN (concentraciones de los anticuerpos y ligandos fluorescentes y tiempos de incubación) para posibilitar la adquisición de las imágenes de microscopía de fluorescencia utilizando tiempos de exposición bajos, de manera que la intensidad de la autofluorescencia de las CGN fuera inferior al 10% de la intensidad de fluorescencia medida en las células tratadas con los agentes de tinción seleccionados. Más aún, con los tiempos de exposición utilizados en los diferentes experimentos incluidos en este trabajo, la señal de autofluorescencia de las CGN no generó imágenes coherentes de las células, por insuficiente contraste entre las células y el fondo de fluorescencia.

La fotodescomposición de las moléculas fluorescentes por irradiación con láseres es un serio problema para la determinación fiable de la eficiencia de FRET y este hecho recomienda el uso de la microscopía de fluorescencia convencional para tal fin. Esta es también la razón por la que en este trabajo hemos controlado cuidadosamente y minimizado la exposición de las CGN marcadas con sondas fluorescentes a destellos repetidos de la lámpara de xenon del microscopio de epifluorescencia durante el manejo de las muestras y durante la adquisición de las imágenes de intensidad de fluorescencia. Los marcadores fluorescentes de los anticuerpos utilizados en este estudio (Alexa488 y Cy3) sufrieron menos de un 10% de disminución de fluorescencia tras exposición a 4 destellos de la lámpara de una duración de 500 milisegundos cada uno, el máximo número de destellos a los que los campos seleccionados de las placas han sido expuestos durante la adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia para análisis cuantitativo. Adicionalmente, las placas utilizadas para minimizar y definir el tiempo de duración del destello de la lámpara de xenon han sido descartadas para el análisis cuantitativo posterior. Finalmente, se ha determinado en cada caso la contribución cuantitativa de la fotodescomposición y la intensidad de eficiencia de FRET se ha determinado como se indica a continuación.

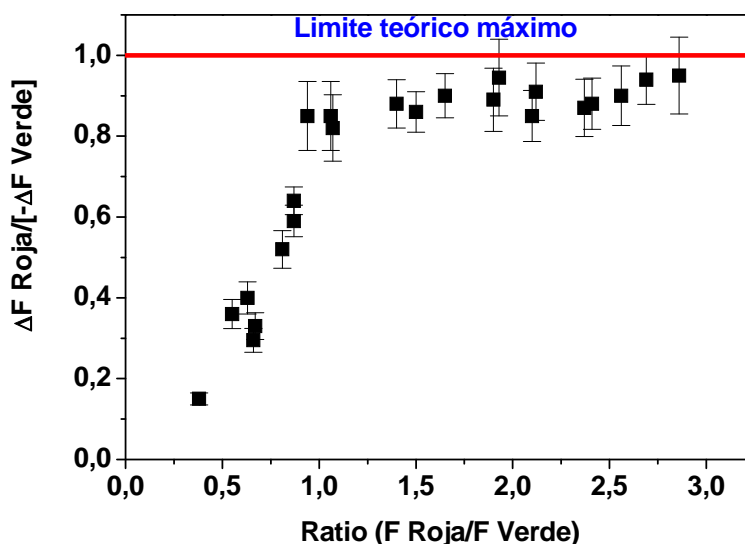
Puesto que ambos FRET y fotodescomposición pueden producir una extinción parcial de la fluorescencia del donador (fluorescencia verde en los experimentos desarrollados en esta Tesis Doctoral), el criterio básico que hemos utilizado para confirmar que FRET contribuye a la disminución de la fluorescencia del donador ha sido la observación paralela de incremento de la fluorescencia del aceptor (fluorescencia roja en los experimentos de esta Tesis Doctoral). Por tanto, un incremento en la relación entre las intensidades de fluorescencia roja y verde (ratio FR/FV) es un indicador rápido y sencillo de presencia de FRET en CGN doblemente marcadas con moléculas

donadoras y aceptoras, por ejemplo, CGN teñidas con anticuerpos específicos de un par de proteínas seleccionadas y sus correspondientes anticuerpos secundarios marcados con Alexa488 y Cy3. Adicionalmente, la necesidad de registrar datos cuantitativos de la intensidad de fluorescencia verde (FV) y roja (FR) limita la duración de los destellos lumínicos de la lámpara xenon a un intervalo de tiempos en los que no se produce saturación de señal en los píxeles de la imagen del campo de observación seleccionado en la placa. Puesto que este hecho ha implicado utilizar en algunos experimentos un tiempo de duración de los destellos lumínicos de la lámpara de xenon diferentes para la adquisición de las imágenes cuantitativas de FV y de FR procedimos en primer lugar a calibrar la intensidad de fluorescencia en función de la duración del destello lumínico. Los resultados mostraron que la intensidad promedio por píxel de la fluorescencia en las neuronas marcadas depende linealmente con el tiempo de duración del destello lumínico, dentro del intervalo de tiempos utilizados en este estudio. Este resultado nos permitió comparar cuantitativamente la extinción de la FV con el incremento de la FR en CGN del mismo campo de observación de una placa Petri.

En el caso de que FRET sea la única causa de extinción de la fluorescencia del donador (FV) y que la migración fotónica entre aceptores sea despreciable, el valor teórico esperado para la relación entre el incremento de la FR y la extinción de la FV es 1. Los resultados mostrados en la figura 4.1.4 demuestran que esta relación ( $\text{Ratio } \Delta F_{\text{Roja}}/\Delta F_{\text{Verde}}$ ) es de  $0,90 \pm 0,05$  para CGN teñidas con varios de los pares de anticuerpos secundarios fluorescentes unidos a los anticuerpos primarios contra pares de proteínas seleccionadas y utilizadas en este estudio, siempre que las CGN teñidas tengan intensidades de las fluorescencias FV y FR balanceadas. Por tanto, podemos concluir que en estas condiciones experimentales FRET es la causa de  $>90 \pm 5\%$  de la extinción de la FV en CGN doblemente teñidas con los fluoróforos donador y aceptor. Por estas razones, todos los experimentos de FRET descritos en las secciones posteriores de esta Tesis Doctoral se han realizado con CGN teñidas de manera que la intensidad de fluorescencia del donador (por ejemplo, anticuerpo secundario marcado con Alexa488) y del aceptor (por ejemplo, anticuerpo secundario marcado con Cy3) está balanceada y con valores de relación de intensidades.

Todas las imágenes de fluorescencia verde y roja presentadas en las secciones posteriores de esta Tesis Doctoral fueron adquiridas como se ha indicado anteriormente en el apartado de “Materiales y métodos” 3.8.2. La intensidad de fluorescencia se relaciona directamente con la intensidad de brillo de las imágenes incluidas en esta

Tesis Doctoral, es decir, una mayor intensidad de fluorescencia para una imagen más brillante y una menor intensidad de fluorescencia para una imagen menos brillante. Los resultados incluidos en esta Tesis Doctoral han sido obtenidos para cada par de FRET promediando los experimentos de, por lo menos, tres preparaciones diferentes y para un número superior a 1000 somas ( $n \geq 6$ ).

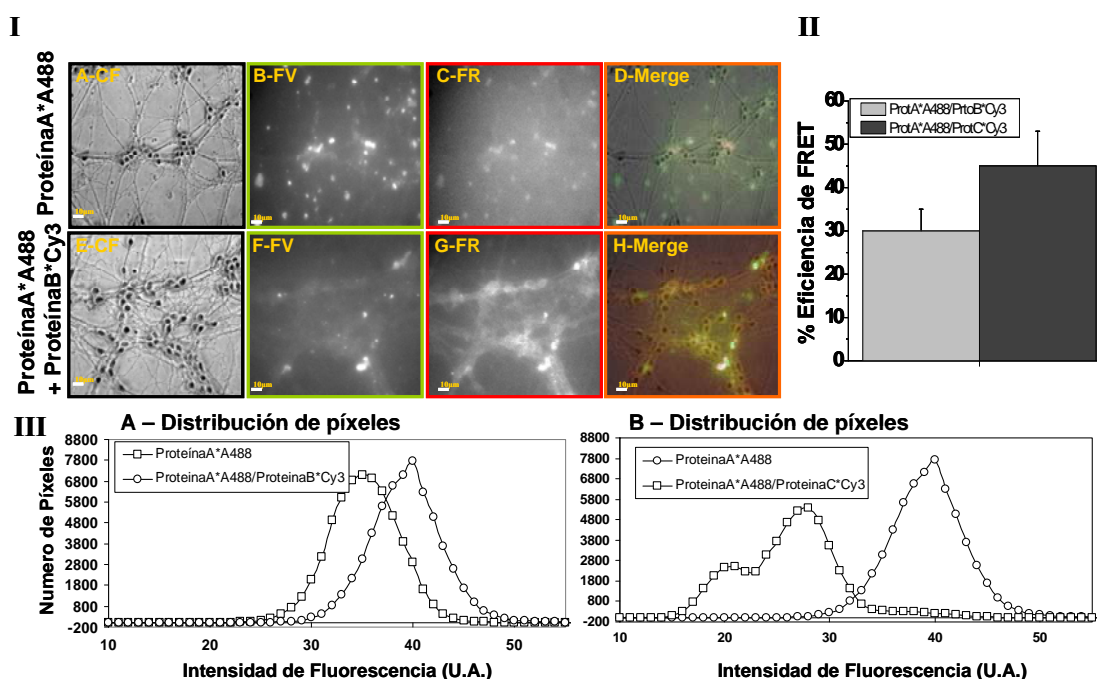


**Figura 4.1.4** – El calibrado de las intensidades de fluorescencia del donador/aceptor es necesario para una determinación experimental fiable de la eficiencia de FRET. Esta optimización de la señal es un criterio mantenido en el diseño de los experimentos realizados en este trabajo. Las intensidades de fluorescencia verde y roja han sido normalizadas al mismo tiempo de exposición y adicionalmente se corrigió la contribución del anticuerpo secundario Alexa488 en la fluorescencia roja como se indica en el capítulo 3.8.3 de “Materiales y métodos”. En los ejes de la gráfica la F significa fluorescencia y el  $\Delta$  significa el incremento de la intensidad de fluorescencia.

En la descripción de los resultados se han analizado de diferentes formas las imágenes obtenidas: (i) observación directa de las imágenes adquiridas en el microscopio (Fig. 4.1.5 – panel I), (ii) análisis cuantitativo de la fluorescencia verde y roja de los somas utilizando el programa HCSImage para obtener la eficiencia promedio de FRET entre los diferentes pares (Fig. 4.1.5 – panel II) y/o (iii) análisis promedio de la intensidad de los píxeles de las imágenes de fluorescencias verde y roja (Fig. 4.1.5 – panel III). En caso de existencia de FRET, el análisis de la distribución de la intensidad de fluorescencia por píxel permite distinguir entre las dos situaciones siguientes:

(i) Una distribución de los aceptores a una distancia fija alrededor de los donadores produce una disminución de la intensidad de fluorescencia de los píxeles sin cambio de la distribución gaussiana (ilustrado en la Fig. 4.1.5 – panel III A).

(ii) Una distribución de los aceptores heterogénea alrededor de los donadores produce una disminución de la intensidad fluorescencia de los píxeles, pero también una clara distorsión en la distribución gaussiana en presencia del aceptor (el resultado esperado en el caso de dos subpoblaciones de aceptores a distancias muy diferentes con respecto a los donadores se ilustra en la Fig. 4.1.5 – panel III B).



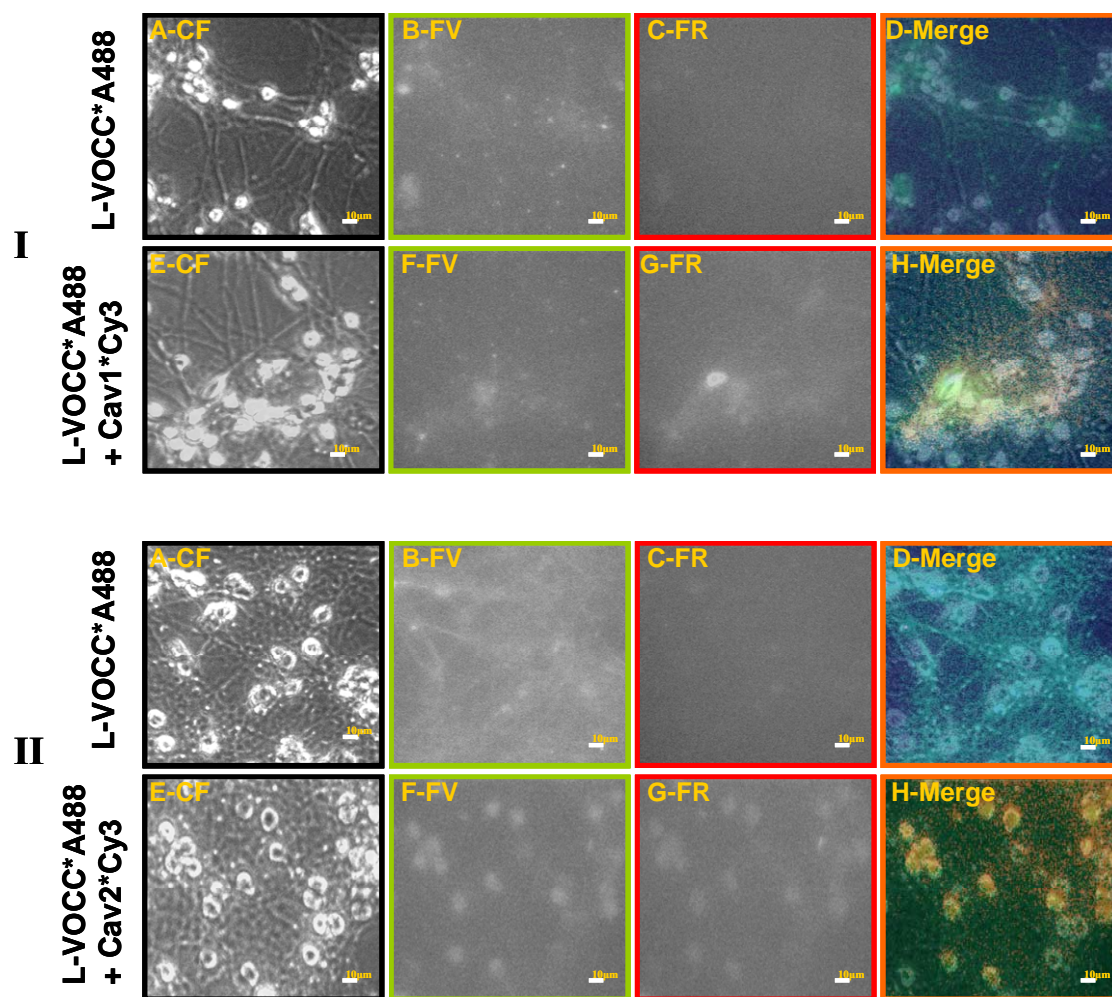
**Figura 4.1.5** - Ilustración de diferentes formas de análisis de las imágenes obtenidas. Colocalización de la ProteínaA con la ProteínaB y con la ProteínaC. Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-ProteínaA (dilución 1:25)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-ProteínaA/Alexa488-IgG y anti-ProteínaB(dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). En las imágenes D y H se muestra la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor). En color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms. Panel II – Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia para los pares anti-ProteínaA/Alexa488-IgG y anti-ProteínaB o anti-ProteínaC/Cy3-IgG. La existencia de FRET entre los dos pares se muestra por el porcentaje de FRET entre el donador y el aceptor (Alexa488-IgG y Cy3-IgG). Panel III - Histograma de la distribución de la intensidad de

fluorescencia de los píxeles de las imágenes analizadas para los pares anti-ProteínaA/anti-ProteínaB (A) y anti-ProteínaA/anti-ProteínaC (B).

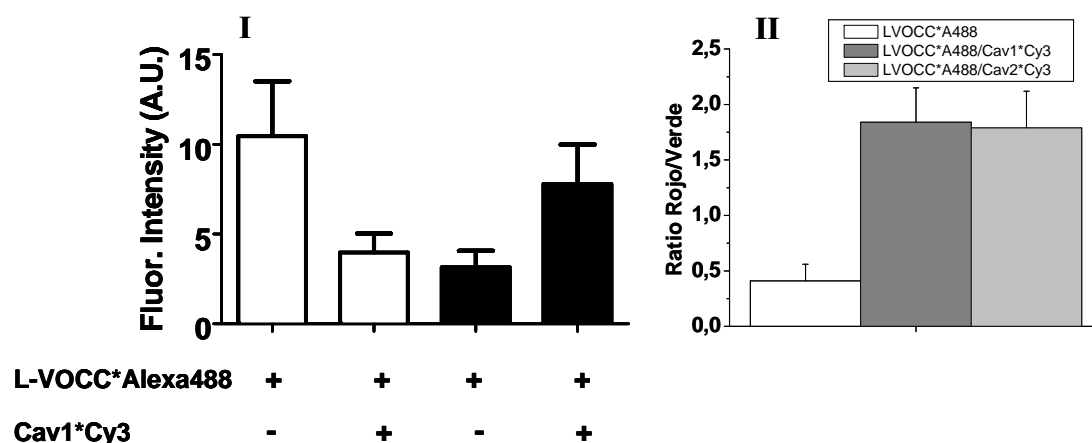
### 4.1.3. Los L-VOCC co-localizan en los sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de las CGN.

Las caveolinas -1 y -2 son proteínas asociadas con los *rafts* lipídicos que han sido utilizadas como marcadores proteicos de los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos (O'Connell *et al.*, 2004; Duggan *et al.*, 2008). Las imágenes de microscopía de fluorescencia de CGN doblemente teñidas con anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG han sido obtenidas con un filtro de excitación de 470 nm, tras comprobar que la excitación directa del fluoróforo Cy3 es despreciable en estas condiciones experimentales. Las imágenes de fluorescencia verde y de fluorescencia roja fueron adquiridas utilizando los espejos dicróicos y los filtros de emisión indicados en la sección 3.8.2 de los “Materiales y métodos”. La observación directa de las imágenes puso de manifiesto una extensa co-localización de ambos anticuerpos como se ilustra por las imágenes mostradas en la figura 4.1.6 y sugirieron la existencia de FRET entre los fluoróforos Alexa488 y Cy3 unidos a los anticuerpos secundarios utilizados en este experimento. Resultados similares fueron obtenidos con CGN doblemente teñidas con anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG (Fig. 4.1.6).

Para una mejor cuantificación de la eficiencia de FRET se han acumulado los resultados obtenidos con duplicados experimentales de 3 preparaciones de CGN diferentes (2 placas/preparación, n = 6) y seleccionando un mínimo de 3-4 campos de cada placa. La figura 4.1.7 muestra en el panel A que la doble tinción de las CGN con los pares de anticuerpos indicados en el párrafo anterior produce una disminución de la intensidad promedio de la fluorescencia del donador (Alexa488-IgG), que se correlaciona estrechamente con la subida observada en la intensidad de la fluorescencia roja del aceptor (Cy3-IgG) que se representa por el incremento de la ratio rojo /verde (Fig. 4.1.7 B). El análisis de las imágenes ha sido refinado hasta el nivel de resolución de los píxeles en los somas neuronales (Fig. 4.1.8). Para garantizar una elevada fiabilidad estadística de este análisis se seleccionaron un amplio número de somas neuronales, 1067 somas de CGN doblemente teñidas con anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG y 1792 somas de CGN doblemente teñidas con anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG.



**Figura 4.1.6** – Colocalización de los L-VOCC con la caveolina-1 (I) y con la caveolina-2 (II): Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-L-VOCC (dilución 1:25)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1 y -2 (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). En las imágenes D y H se muestra la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indica las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms.

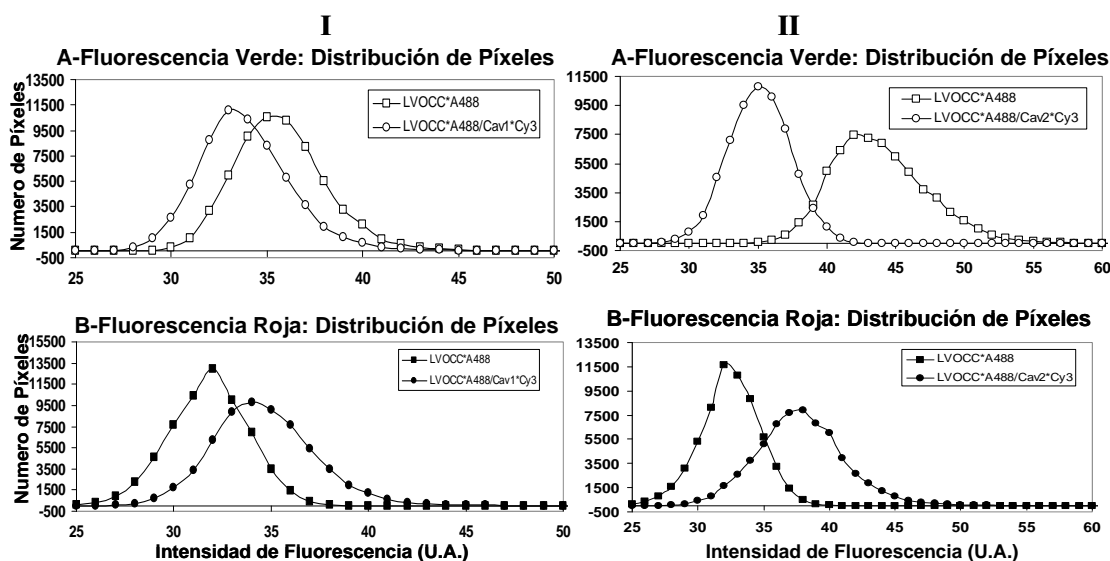


**Figura 4.1.7** – Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia para los pares L-VOCC y caveolina-1 o L-VOCC y caveolina-2. Panel I - La existencia de FRET entre el L-VOCC y la caveolina-1 se muestra por la disminución de la intensidad de fluorescencia verde (barras blancas) y por el incremento de la fluorescencia roja (barras negras). Panel II - La existencia de FRET entre el L-VOCC y la caveolina-1 o -2 esta representada por el incremento en la ratio rojo/verde.

A continuación, una vez acumulados los datos de los somas seleccionados se procedió a obtener la distribución de píxeles en función de la intensidad de fluorescencia por píxel utilizando el *software* Image J (como se indica en el capítulo 3.8.2 de “Materiales y métodos”), tanto para las CGN doblemente teñidas como para las CGN teñidas sólo con el donador de fluorescencia anti-L-VOCC/Alexa488-IgG, ambas adquiridas de campos muy próximos en cada placa. Los resultados obtenidos en este análisis se presentan en la figura 4.1.8 y demuestran que la doble tinción de las CGN producen un fuerte desplazamiento del histograma de píxeles de la fluorescencia verde hacia menores valores de intensidad (resultando en una disminución de la intensidad promedio), mientras que el histograma de píxeles de la fluorescencia roja se desplaza hacia valores de mayor intensidad (resultando en un aumento de la intensidad promedio). Por tanto, el análisis de los píxeles de los somas neuronales confirmó el decrecimiento de la fluorescencia verde en paralelo al incremento de la fluorescencia roja en CGN doblemente teñidas con el donador y el aceptor de fluorescencia con respecto a las CGN teñidas sólo con el donador anti-L-VOCC/Alexa488-IgG. La elevada eficiencia FRET entre los pares donador/aceptor utilizados en las CGN se ilustra muy claramente por la relación entre la intensidad promedio de la fluorescencia roja por píxel y la intensidad promedio de la fluorescencia verde por píxel (ratio FR/FV). Esta ratio FR/FV se incrementó desde un valor de  $0,41 \pm 0,15$  para las CGN



teñidas sólo con el donador anti-L-VOCC/Alexa488-IgG hasta  $1,84 \pm 0,31$  y  $1,79 \pm 0,33$  para las CGN doblemente teñidas con el mismo donador y con los aceptores anti-caveolina-1/Cy3-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG, respectivamente.



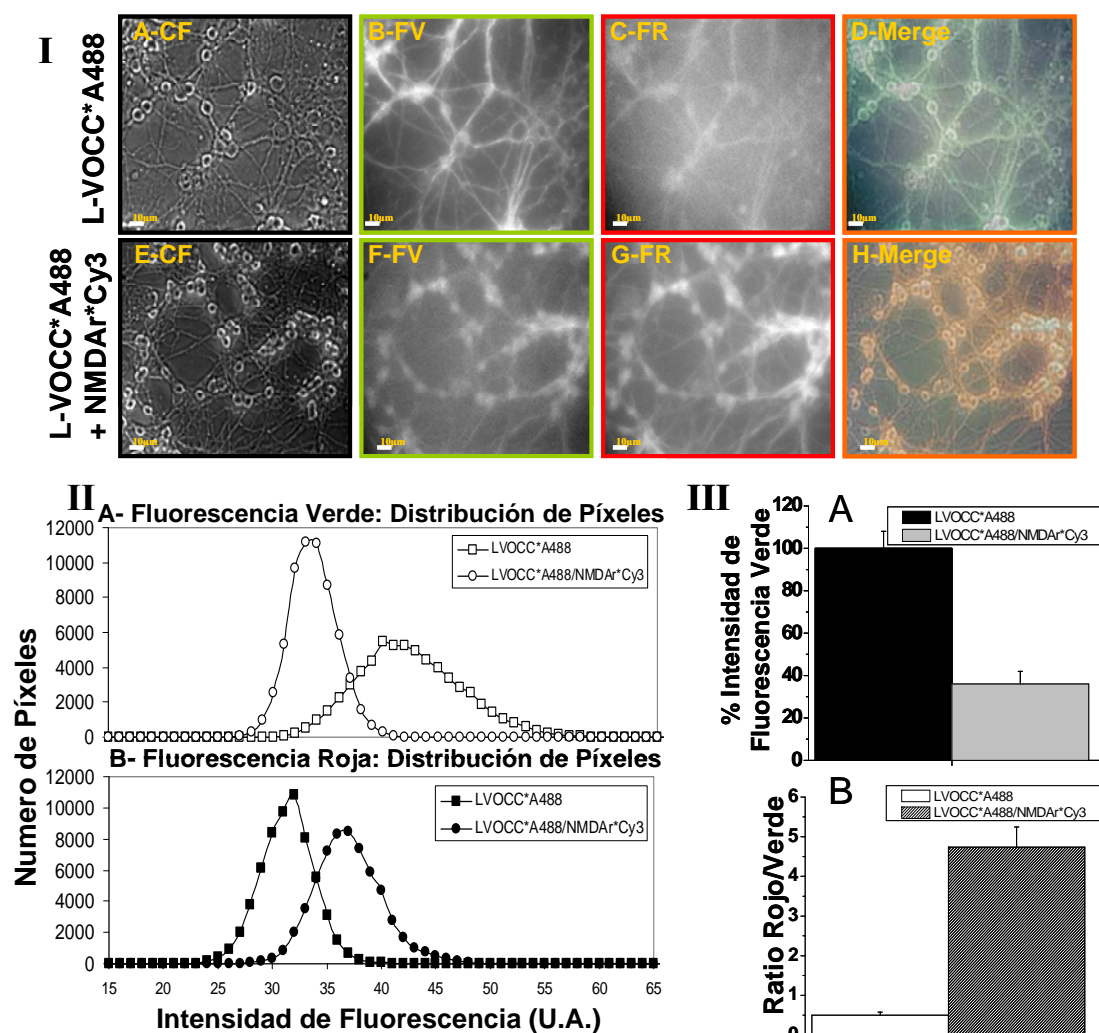
**Figura 4.1.8** – Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para los pares L-VOCC y caveolina-1 (I) y caveolina-2 (II). La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

#### 4.1.4. Los L-VOCC y los NMDAr co-localizan con los sitios de unión a la cólera toxina B y en los sub-microdominios enriquecidos en caveolinas de la membrana plasmática neuronal de las CGN.

Teniendo en cuenta que la entrada de calcio por los L-VOCC y por los NMDAr tiene un papel de extrema importancia en el mantenimiento de la concentración de calcio citosólico necesaria para la supervivencia y en la excitabilidad de las CGN maduras (Balazs *et al.*, 1988; Franklin y Johnson, 1992; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005), decidimos cuestionar experimentalmente la proximidad de estos dos sistemas y su posible partición en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos.

En las imágenes de microscopía de fluorescencia de las CGN doblemente teñidas con anti-LVOCC/Alexa488-IgG y anti-NMDAr/Cy3-IgG se observa una co-localización extensiva de los dos anticuerpos, como se ilustra en las imágenes de fusión de las dos fluorescencias (imágenes *merge*) presentadas en la figura 4.1.9 – panel I. Estos resultados fueron sometidos a un análisis de píxeles con el *software* Image J (figura 4.1.9 – panel II). Con la magnificación y el *binning* utilizados para adquirir las

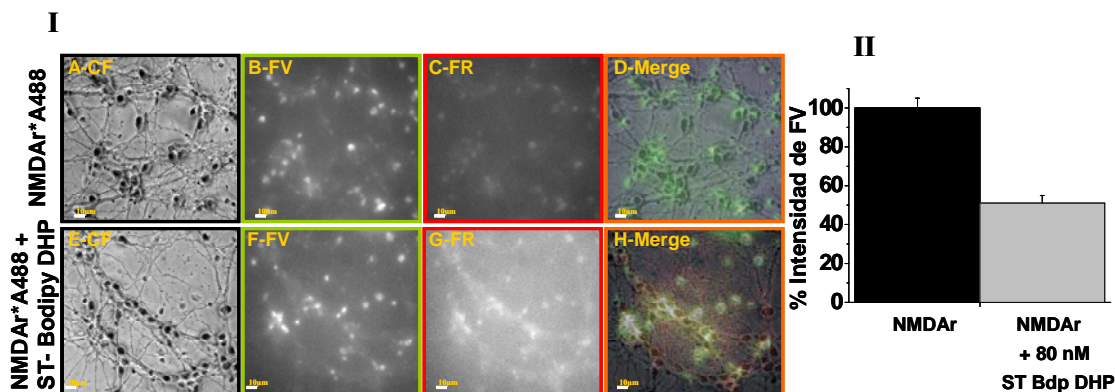
imágenes, un píxel tiene un tamaño de área de  $\sim 0.7 \mu\text{m} \times 0.7 \mu\text{m}$ . El análisis de píxeles en el soma neuronal demostró la existencia de FRET entre la sonda Alexa488-IgG y la sonda Cy3-IgG, ya que este análisis confirma la disminución de intensidad de la fluorescencia verde en paralelo al incremento promedio de la intensidad de la fluorescencia roja en las CGN doblemente teñidas con respecto a las CGN únicamente teñidas con el donador anti-LVOCC/Alexa488-IgG. La elevada eficiencia promedio de FRET entre este par donador/aceptor se monitoriza muy claramente utilizando la relación entre la intensidad promedio de la fluorescencia roja por píxel y la intensidad promedio de la fluorescencia verde por píxel, como se representa en la figura 4.1.9 – panel III y en la tabla 4.1 (localizada en la página final de este capítulo de resultados). Los resultados obtenidos permiten concluir que para este par de anticuerpos se observa una gran eficiencia de FRET, porque: (i) se observa un  $64 \pm 6\%$  de extinción promedio de la intensidad de fluorescencia del donador (emisión de la fluorescencia verde de la sonda Alexa488) y (ii) un incremento de 9.6 veces en la relación entre las intensidades de fluorescencia roja y verde, desde  $0.50 \pm 0.08$  para las CGN teñidas solamente con el donador anti-L-VOCC/Alexa488-IgG hasta  $4.8 \pm 0.5$  para las CGN doblemente teñidas con el mismo donador y el anti-NMDAr/Cy3-IgG (Fig. 4.1.9 – panel III). Por lo tanto, estos resultados conducen a la conclusión de que la sonda donadora (Alexa488) y la aceptora (Cy3) están separadas por una distancia promedio menor que el valor  $R_0$  para este par de FRET, es decir, menos de 5 nm. Teniendo en cuenta que los anticuerpos IgG utilizados para marcar ambas proteínas tienen una forma de “T” de dimensiones medias de aproximadamente  $25 \times 18 \text{ nm}$  (Saphire *et al.*, 2001) y que para el caso de múltiples aceptores por donador la eficiencia de FRET es menor del 2% para un par donador/aceptor separado por una distancia  $\geq 2 \cdot R_0$  (Gutierrez-Merino *et al.*, 1994), esto indica que el L-VOCC y el NMDAr están separados por una distancia menor de 80 nm.



**Figura 4.1.9** – Colocalización del L-VOCC con el NMDAr: Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-L-VOCC (dilución 1:25)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) anti-L-VOCC (dilución 1:25)/Alexa488-IgG y anti-NMDAr (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H muestran la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), mostrándose en color naranja las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms. Panel II - Histogramas de distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el L-VOCC y NMDAr. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B. Panel III - El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia. La existencia de FRET entre el L-VOCC y el NMDAr se muestra por la disminución de la intensidad de fluorescencia verde representada en A y el incremento de la ratio rojo/verde en B.

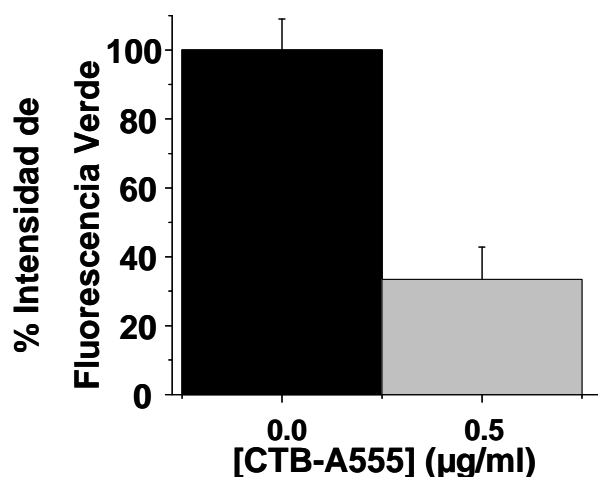
Este punto fue confirmado utilizando un par de FRET alternativo con una distancia efectiva de FRET de menor alcance. Para este fin utilizamos la ST-bodipy dihidropiridina, un ligando fluorescente que se liga al L-VOCC, es decir, utilizando una molécula de menores dimensiones que funciona como aceptor del NMDAr marcado con anti-NMDAr/Alexa488-IgG. Las imágenes de fluorescencia de las CGN doblemente teñidas con el anti-NMDAr/Alexa488-IgG y con 80 nM de ST-bodipy dihidropiridina muestran también la existencia de FRET para este par donador/aceptor (Fig. 4.1.10 – panel I). Además, la eficiencia de FRET promedio obtenida es también elevada, con un valor de extinción de la fluorescencia verde del donador del  $49 \pm 5\%$ , lo que permite concluir que el sitio de unión de la ST-bodipy dihidropiridina está aproximadamente a  $6 \pm 1$  nm de distancia del donador fluorescente Alexa488 que marca los NMDAr. Considerando el tamaño medio del L-VOCC y del NMDAr ( $\sim 10$ - $15$  nm de diámetro), la localización del sitio de unión de la dihidropiridina en el centro del dominio extracelular voluminoso del L-VOCC (Hockerman *et al.*, 1995; Brauns *et al.*, 1997) y el tamaño del complejo de anticuerpos primarios y secundarios IgG ( $\sim 35$  nm), estos resultados conducen a la conclusión de que el L-VOCC y el NMDAr son proteínas vecinales en la membrana plasmática. En el análisis cuantitativo de píxeles de las imágenes de FRET se puede observar que no hay indicación de dos poblaciones separadas en la distribución de píxeles, confirmando una co-localización extensiva del NMDAr con el L-VOCC en la membrana plasmática de la CGN maduras *in vitro* (Fig. 4.1.10 – panel II). El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1400 para el par anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-NMDAr/Cy3-IgG y de 1743 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y ST-bodipy dihidropiridina.

En el apartado anterior se ha identificado la asociación del L-VOCC con los *rafts* lipídicos utilizando como marcadores de *rafts* la caveolina-1 y -2 (Fig. 4.1.6 - 4.1.8). En el caso del NMDAr, además de los anticuerpos que marcan proteínas asociadas a los *rafts* lipídicos como la caveolina-1, la caveolina-2 y la flotillina se ha utilizado otro marcador adicional de los *rafts* lipídicos, la toxina B del cólera (CTB).

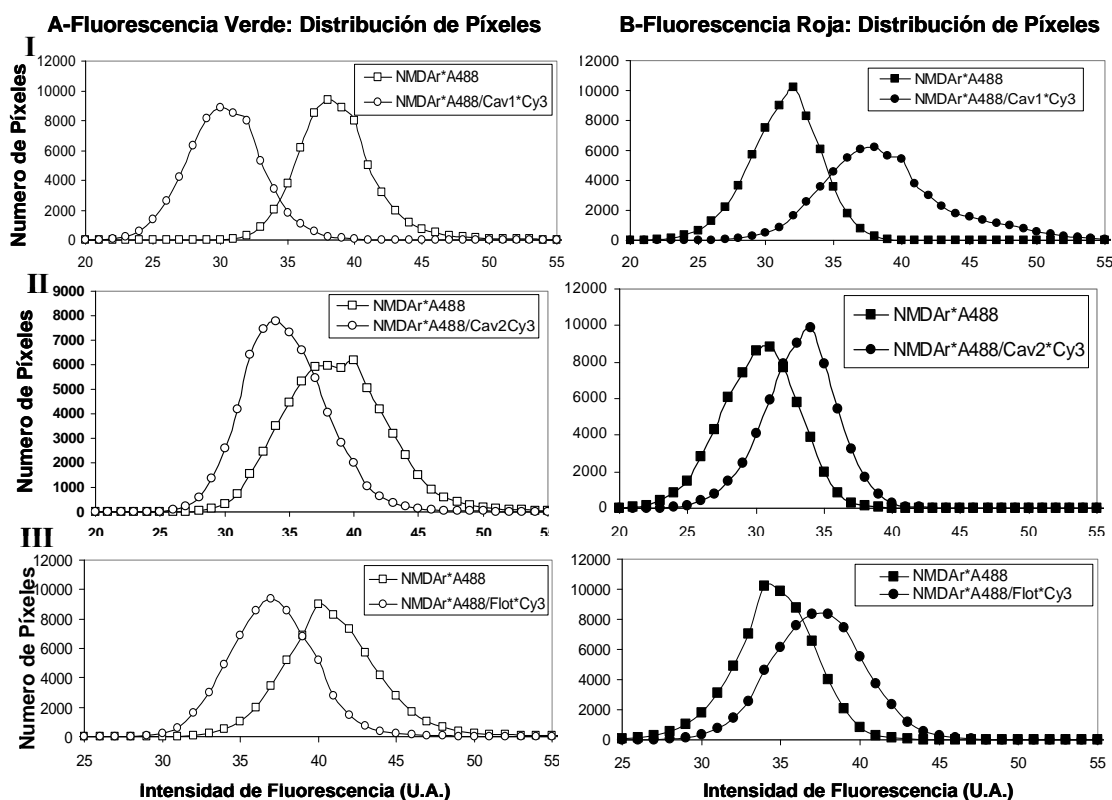


**Figura 4.1.10** – Colocalización del NMDAr con el ST-Bodipy DHP: (I) Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-NMDAr (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) anti-NMDAr/Alexa488-IgG y ST-Bodipy DHP(80 nM) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H muestran la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor). En color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s. (II) El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia entre el NMDAr y el ST-Bodipy DHP indica la existencia de FRET, que se traduce en una fuerte disminución de la intensidad de fluorescencia verde (FV).

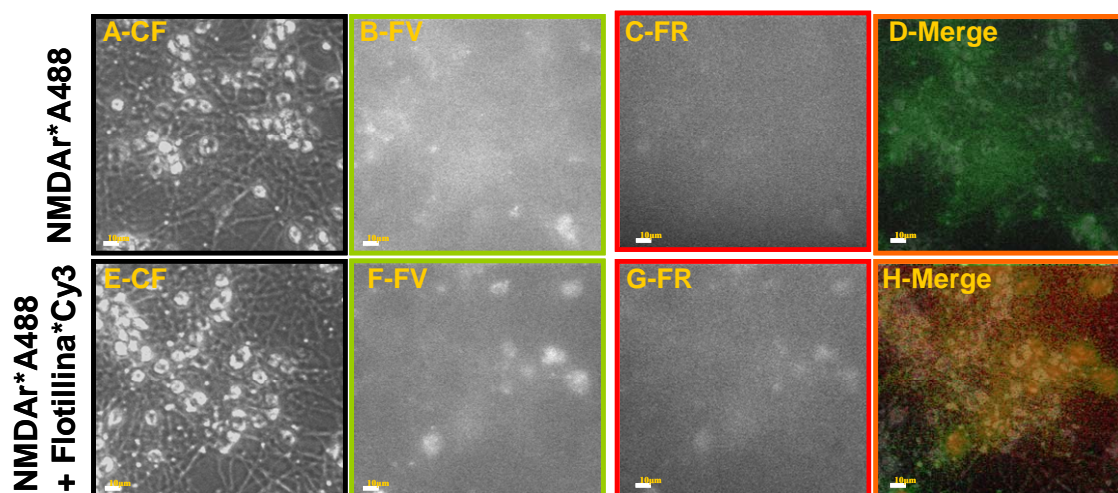
En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de imágenes de FRET utilizando el anti-NMDAr/Alexa488-IgG como donador y como aceptor la CTB-Alexa555 (Fig. 4.1.11), anti-caveolina-1/Cy3-IgG (Fig. 4.1.12 – panel I), anti-caveolina-2/Cy3-IgG (Fig. 4.1.12 – panel II) y anti-flotillina/Cy3-IgG (Fig. 4.1.12 – panel III y 4.1.13). El porcentaje de extinción de la fluorescencia del donador (Fig. 4.1.11 y 4.1.14) indica una elevada eficiencia de FRET para todos estos pares. El valor de eficiencia de FRET obtenido para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y CTBAlexa555,  $66 \pm 9\%$ , es idéntico al valor obtenido en los experimentos realizados con las CGN teñidas con el par donador/aceptor: 8 nM DM-bodipy dihidropiridina (un ligando fluorescente del L-VOCC (Knaus *et al.*, 1992; Berger *et al.*, 1994)/ 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la toxina B del cólera conjugada con Alexa555 (CTB-A555) (Fig. 4.1.15). El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 2611 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y CTB-A555, 1925 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG, de 1446 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y de 1063 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-flotillina/Cy3-IgG.



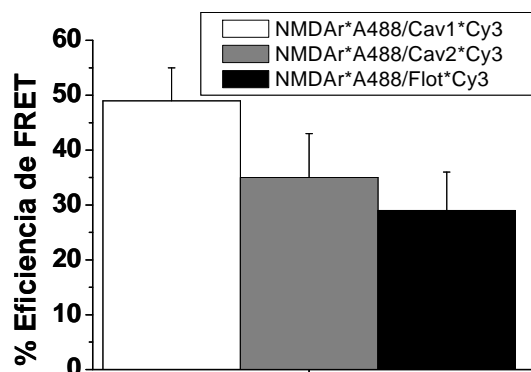
**Figura 4.1.11** – El análisis cuantitativo de las imágenes para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y CTB-A555 indica la existencia de una elevada eficiencia de FRET entre esto par donador/aceptor, que se puede visualizar de manera cuantitativa por la fuerte disminución de la intensidad promedio de la fluorescencia verde.



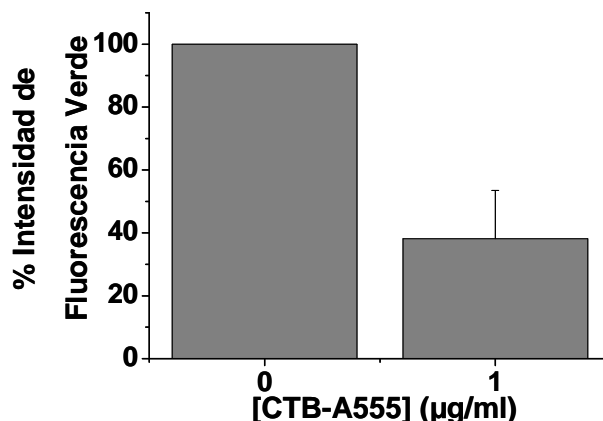
**Figura 4.1.12** – Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de los píxeles de las imágenes analizadas para los pares NMDAr y caveolina-1 (I), caveolina-2 (II) y flotillina (III). La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.



**Figura 4.1.13** – Colocalización del NMDAr con la flotillina: Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-NMDAr (dilución 1:100)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-flotillina (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de imágenes de contraste de fases (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms.



**Figura 4.1.14** – Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia para los pares FRET anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1 o anti-caveolina-2 o anti-flotillina/Cy3-IgG. En el eje de ordenadas de la figura se ha representado la eficiencia promedio de FRET entre cada uno de estos pares.



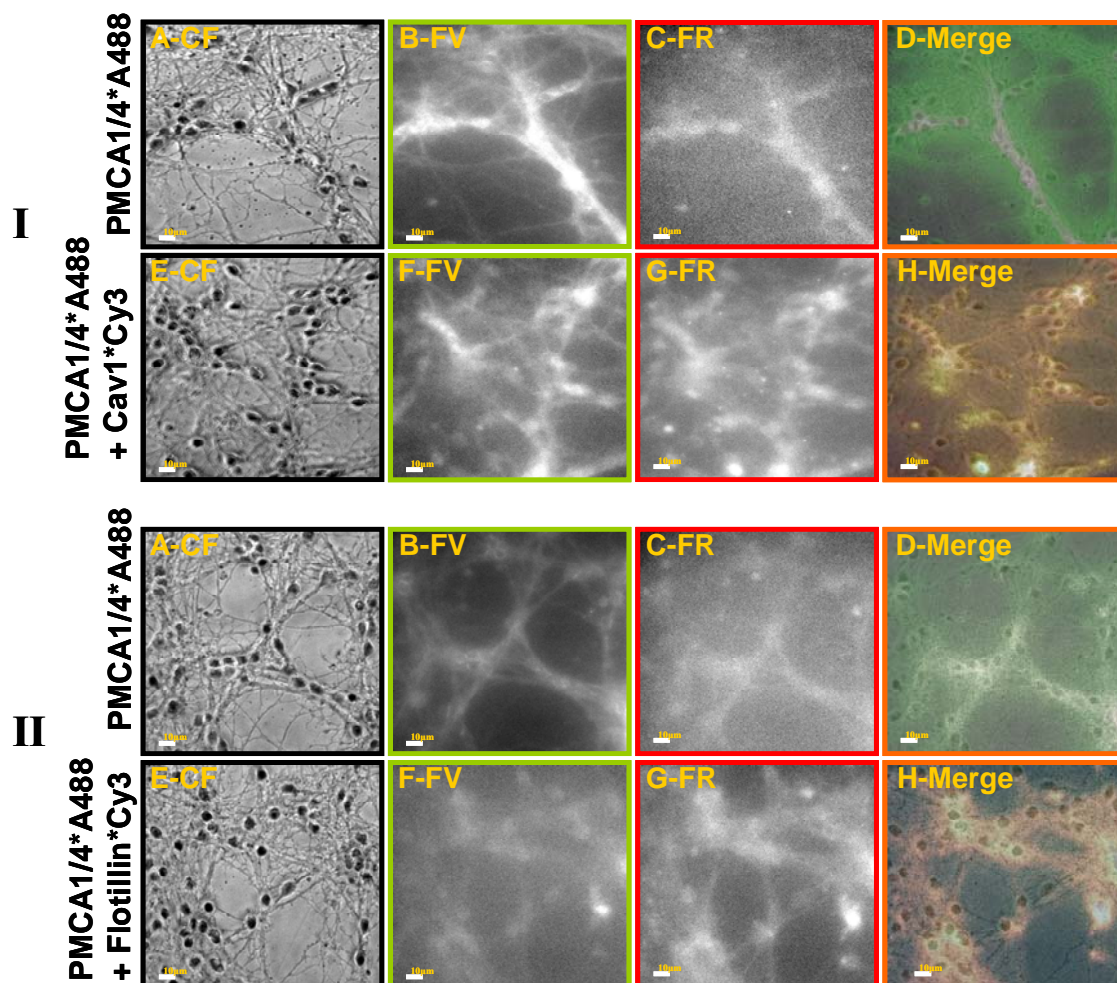
**Figura 4.1.15** – El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia para el par DM-Bodipy DHP y CTB-A555 indica la existencia de una elevada eficiencia de FRET entre este par donador/aceptor, como lo demuestra la fuerte disminución promedio de la intensidad de la fluorescencia verde del donador.

#### **4.1.5. Los principales sistemas de extrusión de calcio de la membrana plasmática neuronal, la PMCA y el NCX están presentes en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos.**

La existencia de microcompartimentos de ión calcio focalizados cerca de la membrana plasmática neuronal, asociados a gradientes transitorios focalizados de calcio citosólico, es un hecho ampliamente documentado, como ha sido reseñado en la introducción de esta Tesis Doctoral. Una distribución focalizada de los sistemas de entrada y de extrusión del calcio en la membrana plasmática permitiría racionalizar la generación de gradientes transitorios de calcio cerca de la membrana plasmática neuronal. Esta hipótesis se ve apoyada por la presencia de los principales sistemas de extrusión de calcio (PMCA y NCX) en los *rafts* lipídicos purificados, un hecho experimental que hemos documentado previamente en la sección 4.1.1 de los “Resultados” de esta Tesis Doctoral. Por estas razones, hemos cuestionado experimentalmente utilizando imágenes de FRET si los sistemas de extrusión de calcio se encuentran dentro del ámbito espacial de los submicrodominios de las CGN analizados en los apartados anteriores de este capítulo de “Resultados”. Los resultados obtenidos han demostrado la existencia de FRET utilizando el anti-PMCA1/4/Alexa488-IgG como donador y como aceptor anti-caveolina-1/Cy3-IgG (Fig.



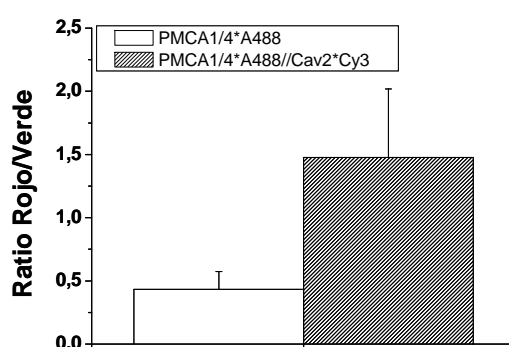
4.1.16 – panel I), anti-flotillina/Cy3-IgG (Fig. 4.1.16 – panel II) o anti-caveolina-2/Cy3-IgG (Fig. 4.1.17).



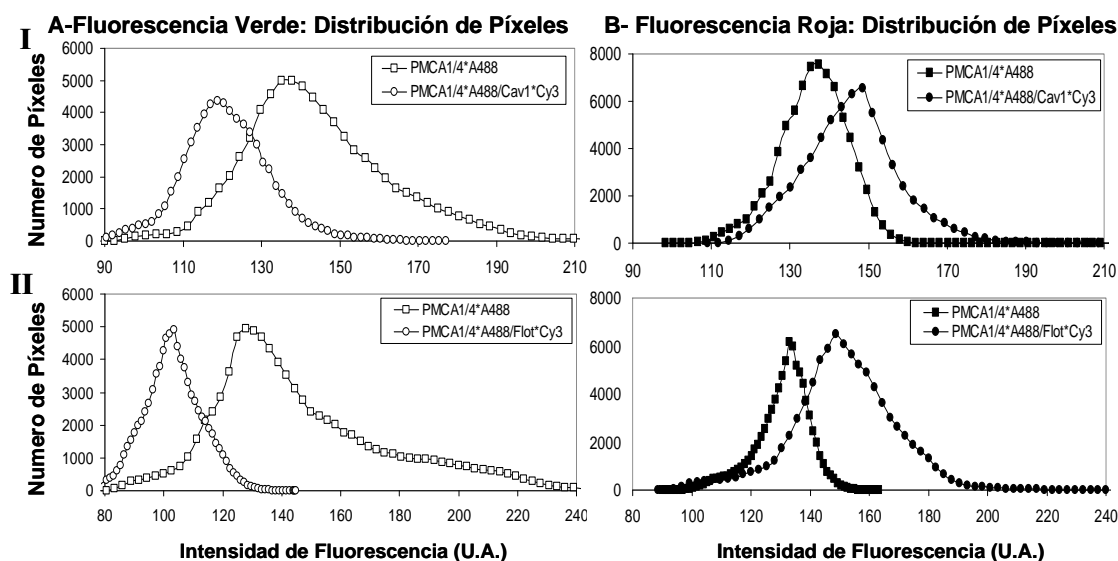
**Figura 4.1.16** – Colocalización de la PMCA1/4 con la caveolina-1 (I) y con la flotillina (II): Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-PMCA1/4 (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-PMCA1/4/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1 y anti-flotillina (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de imágenes de contraste de fases (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s.

El análisis de la distribución de píxeles en la intensidad de fluorescencia verde de las imágenes reveló un desplazamiento de todo el pico con un perfil Gaussiano hacia valores de menor intensidad de fluorescencia (Fig. 4.1.18). La menor intensidad de FRET desde el donador anti-PMCA1/4/Alexa488-IgG hacia anti-caveolina-1/Cy3-IgG

indica una mayor distancia de separación promedio entre PMCA y caveolina-1 con respecto a la que se deriva de los resultados de FRET obtenidos con los pares anti-PMCA1/4/caveolina-2 y anti-PMCA1/4/flotillina. Además, el promedio de las eficiencias de FRET fue elevado para todos estos pares (Fig. 4.1.19 y tabla 4.1), con una extinción promedio del donador de fluorescencia verde  $\geq 30\%$ . El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 2113 para el par anti-PMCA1/4//Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG, de 2542 para el par anti-PMCA1/4//Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y de 2557 para el par anti-PMCA1/4//Alexa488-IgG y anti-flotillina/Cy3-IgG.

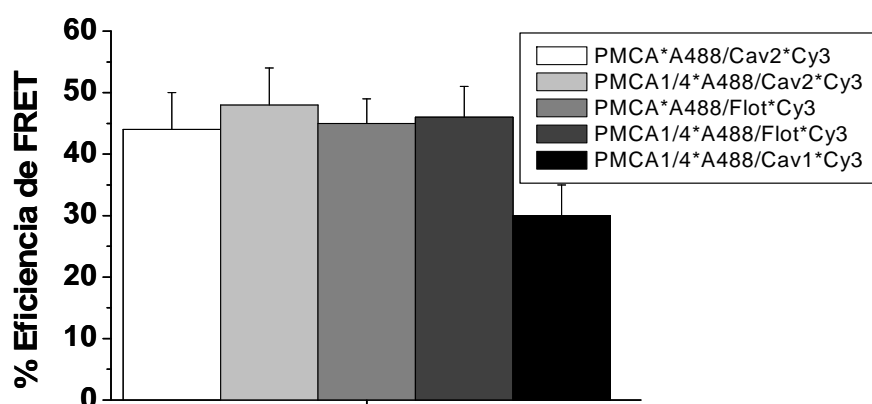


**Figura 4.1.17** - Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia para el par PMCA1/4 y caveolina-2: Incremento de la ratio rojo/verde cuando los dos anticuerpos están presentes (el donador A488-IgG y el aceptor Cy3-IgG).



**Figura 4.1.18** – Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para los pares PMCA1/4 y caveolina-1 (I) y flotillina (II). La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

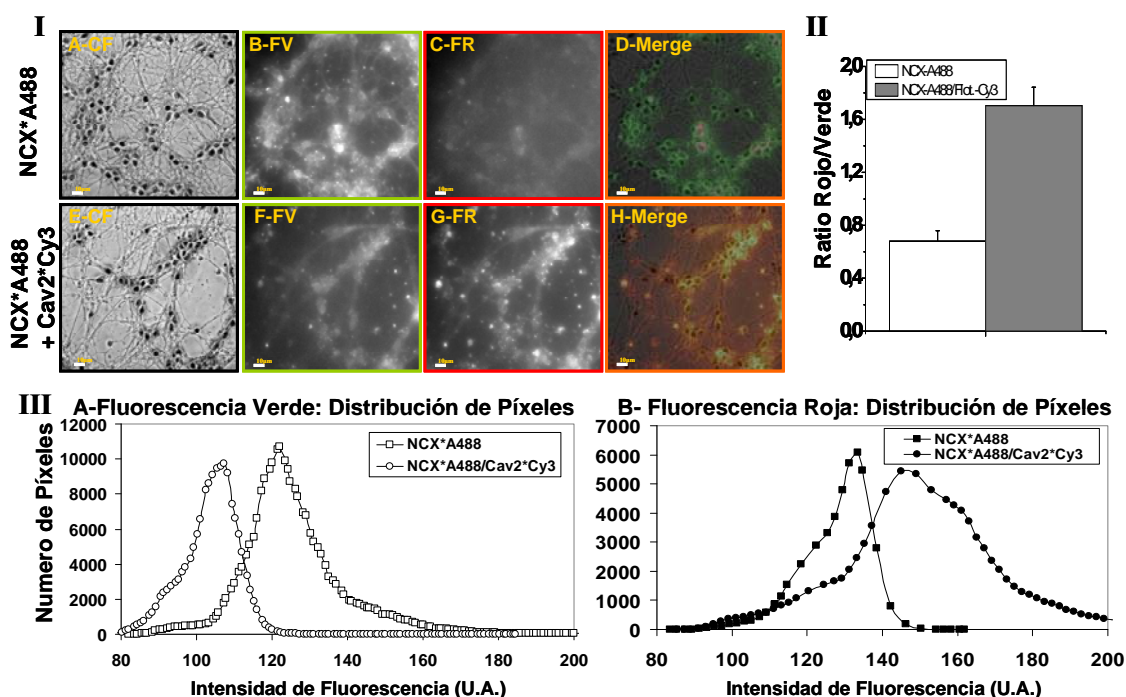
Estos resultados fueron adicionalmente confirmados con el anticuerpo anti-PMCA (Fig. 4.1.19). La eficiencia de FRET para las CGN teñidas primeramente con este anticuerpo anti-PMCA marcado con el Alexa488-IgG fue del  $45\pm4\%$  utilizando como aceptor anti-flotillina/Cy3-IgG y de  $44\pm6\%$  utilizando como aceptor anti-caveolina-2/Cy3-IgG (Fig. 4.1.19). El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 2354 para el par anti-PMCA/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y de 2192 para el par anti-PMCA/Alexa488-IgG y anti-flotillina/Cy3-IgG. Puesto que los anticuerpos anti-PMCA y anti-caveolina-1 son los dos de origen conejo no ha sido posible utilizar la herramienta de FRET para este par en particular. Este conjunto de resultados confirman la amplia asociación de la PMCA con los sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de CGN maduras en cultivo, lo que es consistente con resultados obtenidos por otros laboratorios utilizando otros modelos experimentales (Sepulveda *et al.*, 2006 y Jiang *et al.*, 2007). Adicionalmente, estos resultados resaltan la partición de esta proteína en la malla del citoesqueleto asociado a estos microdominios más enriquecida en la flotillina y en la caveolina-2 que en la caveolina-1.



**Figura 4.1.19** - Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia para los siguientes pares: PMCA/caveolina-2, PMCA/flotillina, PMCA1/4//caveolina-1, PMCA1/4//caveolina-2 y PMCA1/4//flotillina: Eficiencia promedio de FRET entre cada par donador/aceptor.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia han demostrado la existencia de FRET para los pares de anticuerpos anti-NCX/Alexa488-IgG (utilizado como donador) y como aceptores el anti-caveolina-2/Cy3-IgG y el anti-flotillina/Cy3-IgG (Fig. 4.1.20). Una vez más el aceptor anti-caveolina-1/Cy3-IgG no se ha podido utilizar porque su origen es de conejo como el anti-NCX y el anti-NCX1. Asimismo, las eficiencias de

FRET fueron  $\geq 30\%$  para los diferentes pares, como puede observarse en la figura 4.1.21 – panel I y en la tabla 4.1. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 2012 para el par anti-NCX/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y de 1895 para el par anti-NCX/Alexa488-IgG y anti-flotillina/Cy3-IgG. La clara distorsión de la distribución Gaussiana de los píxeles en la intensidad de fluorescencia roja para el caso del anti-NCX/anti-caveolina-2 marcados respectivamente con las sondas donador/aceptor Alexa488-IgG/Cy3-IgG implica la existencia de heterogeneidad en la distribución espacial para estos pares (Fig. 4.1.20, panel III).

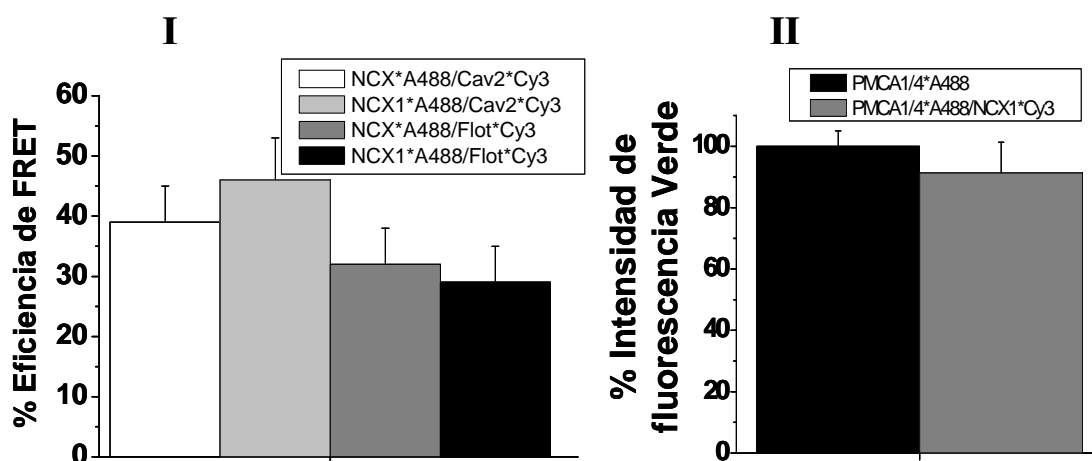


**Figura 4.1.20** – Colocalización del NCX con la caveolina-2 (I y III) y la flotillina (II): Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-NCX (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-NCX/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2 (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s. Panel II – El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia del par compuesto por el NCX y la flotillina indica la existencia de FRET y se muestra por el incremento de la ratio rojo/verde cuando los dos anticuerpos están presentes (el donador Alexa488-IgG y el aceptor Cy3-IgG). Panel III – Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el par NCX y caveolina-2. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

Estos resultados fueron confirmados con un segundo anticuerpo, el anti-NCX1 (Fig. 4.1.21) que produjo eficiencias de FRET muy próximas a las obtenidas con el anticuerpo anterior, el anti-NCX (Fig. 4.1.21 – panel I, tabla 4.1).

Así, los resultados tomados en conjunto confirman que el NCX esta extensivamente asociado a los sub-microdominios de los *rafts* lipídicos en la membrana plasmática neuronal de las CGN maduras en cultivo y, además, indican una partición preferencial de esta proteína en la proximidad de la flotillina y de la caveolina-2 en la malla del citoesqueleto. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1953 para el par anti-NCX1/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y de 1813 para el par anti-NCX1/Alexa488-IgG y anti-flotillina/Cy3-IgG.

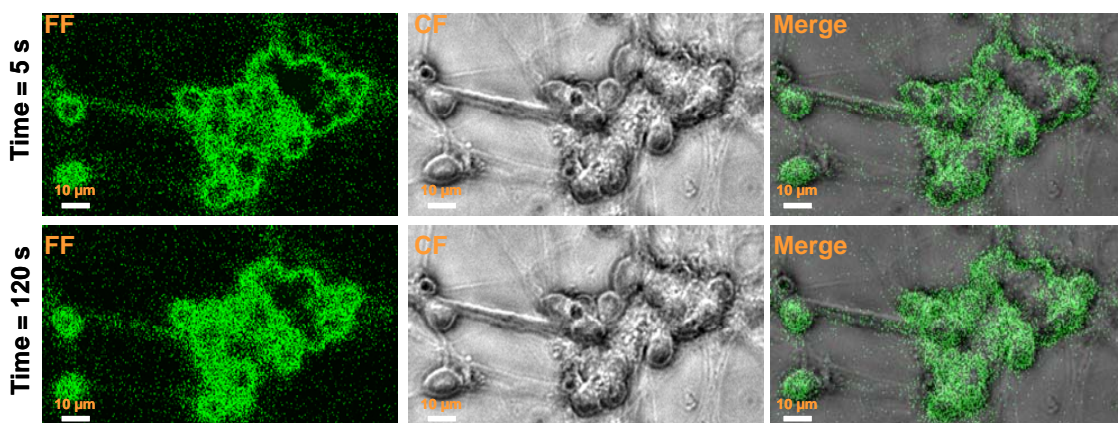
Una vez demostrada la presencia de estas proteínas en los *rafts* lipídicos procedimos a analizar si la PMCA y el NCX se encuentran entre sí a una distancia inferior al límite de distancia FRET utilizando anticuerpos marcados con las sondas fluorescentes Alexa488 y Cy3. En la figura 4.1.21 –panel II se puede observar que no se observa FRET entre anti-PMCA1/4/Alexa488-IgG y anti-NCX1/Cy3-IgG. Por tanto, se puede concluir que la PMCA y el NCX están separados por más de 80 nm dentro de los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos.



**Figura 4.1.21** – NCX esta a una distancia de FRET con la caveolina-2 y con la flotillina pero no con la PMCA. El análisis cuantitativo de FRET para las imágenes de fluorescencia entre los pares compuestos por el NCX y la caveolina-2 y la flotillina y por los pares compuestos por el NCX1 y la caveolina-2 y la flotillina se representa mediante la eficiencia de FRET (I) entre cada par. La ausencia de una caída estadísticamente significativa en la fluorescencia verde para el par PMCA1/4 y el NCX1 indica la no existencia de FRET (II).

#### 4.1.6. La PMCA y el NCX co-localizan con el NMDAr en submicrodominios asociados a *rafts* lipídicos.

Esta bien establecido que la aplicación de 50-100  $\mu\text{M}$  L-glutamato en CGN maduras en cultivo aumenta la concentración del calcio citosólico, debido en gran parte a la activación del NMDAr puesto que este aumento es casi totalmente bloqueado por inhibidores del NMDAr (Garcia-Bereguain *et al.*, 2008 y Tiago *et al.*, 2011). Una observación más detallada de la cinética de subida de calcio a tiempos cortos después de la adición de L-glutamato reveló una distribución dispersa de microcompartimentos de elevado calcio cerca de la membrana plasmática de las CGN (Fig. 4.1.22). Estos microcompartimentos periféricos de elevado calcio tienen un tamaño medio de solamente unos pocos de píxeles, o sea, con un diámetro menor de 1  $\mu\text{m}$ . Una hipótesis simple a tener en cuenta para explicar este resultado es que los sistemas principales de salida de calcio de la membrana plasmática neuronal estén localizados cerca de los principales puntos de entrada de calcio (NMDAr), de tal manera que pueden atenuar fuertemente la propagación de la onda de calcio a lo largo del citosol.



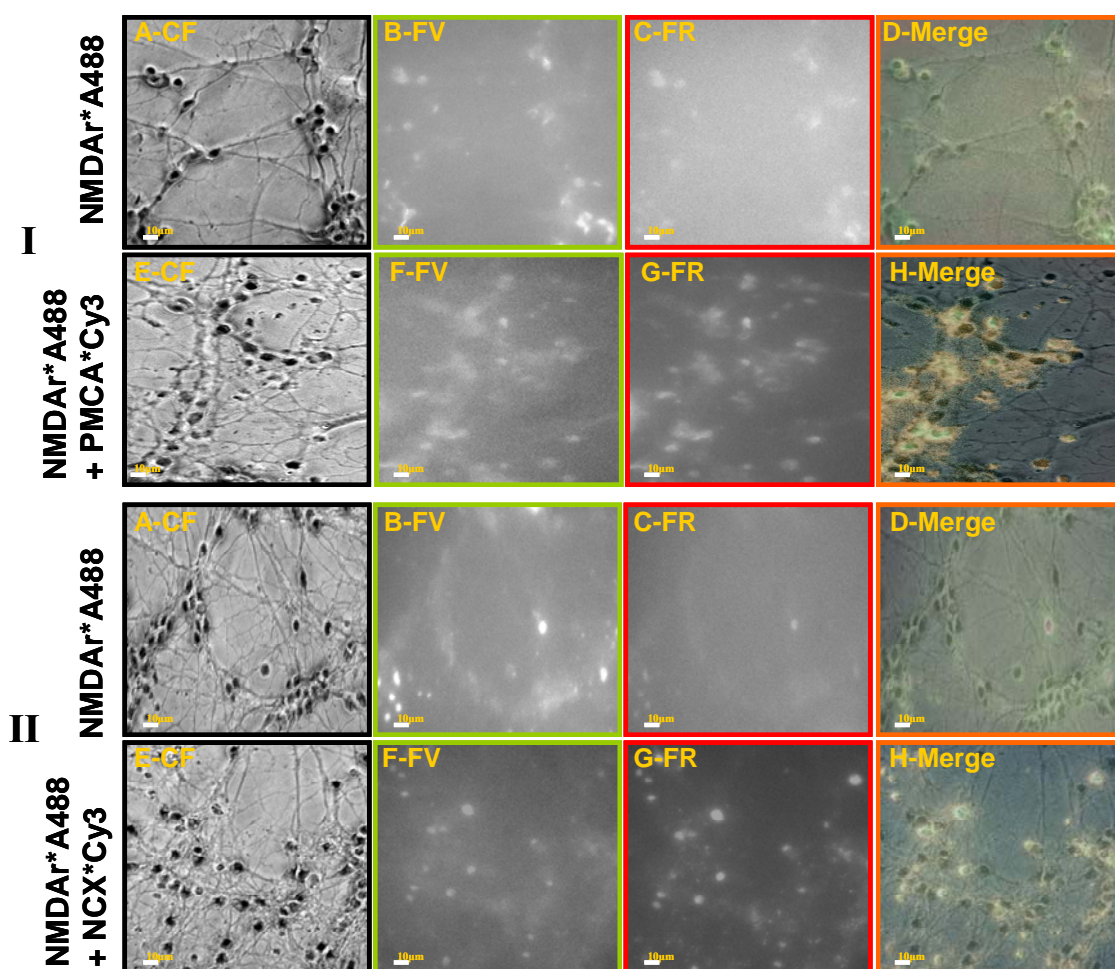
**Figure 4.1.22** - L-glutamato provoca puntos de acumulación de calcio citosólico focalizados cerca de la membrana plasmática de las CGNs. Las CGN en cultivo se incubaron con fura-2 AM como se indica en el capítulo 3.10.1 de “Materiales y métodos”. Posteriormente se cambió el medio a MLocke 25 para lavar las células de la sonda no adsorbida. Inmediatamente tras la adición de 100  $\mu\text{M}$  de L-glutamato al medio extracelular, se adquirieron imágenes a los tiempos que se indican en el lado izquierdo de cada imagen (tiempo en segundos). Código de color utilizado: mayor intensidad del color verde implica un valor de la ratio (340/380). La superposición (*merge*) de las imágenes de fluorescencia de fura-2 AM (FF) con las imágenes de contraste de fase (CF), ayuda a la localización de la señal asociada a los límites físicos de las CGN (CF).

Por esta razón, hemos abordado el estudio de la proximidad entre los principales sistemas de entrada y de extrusión de calcio de la membrana plasmática de las CGN para el control de la homeostasis del calcio citosólico en estas neuronas, o sea la proximidad entre las proteínas responsables por la entrada de calcio (L-VOCC y NMDAr) y las proteínas responsables de la salida de calcio en las CGN (PMCA y NCX). Este punto se ha abordado también mediante el análisis de imágenes de FRET utilizando anticuerpos específicos para los principales sistemas de extrusión de calcio de la membrana plasmática neuronal, PMCA y NCX, que se expresan en las CGN maduras en cultivo (Guerini *et al.*, 1999; Pulina *et al.*, 2006). La figura 4.1.23 muestra una selección de varias de las imágenes de microscopia de fluorescencia obtenidas para las CGN doblemente teñidas con anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-PMCA/Cy3-IgG o anti-NCX/Cy3-IgG. Tanto la observación directa de las imágenes de fusión de las imágenes de fluorescencia verde y roja (*merge*) como el análisis de intensidad de píxeles de los somas neuronales han demostrado la existencia de FRET entre los anticuerpos marcados con Alexa488-IgG y Cy3-IgG (Fig. 4.1.24 – panel I y III). Sin embargo, para estos pares de anticuerpos se observa una distorsión significativa de la distribución Gaussiana de la intensidad de fluorescencia por píxel, más notable en las imágenes de fluorescencia roja, indicando una distribución difusa y dispersa de la PMCA y del NCX alrededor del NMDAr. Las eficiencias medias de FRET para estos pares estimadas a partir de la extinción de fluorescencia verde del donador son también elevadas (tabla 4.1), lo que significa que estas proteínas están dentro del intervalo de distancia de FRET cuando se utilizan anticuerpos secundarios marcados con sondas fluorescentes. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1229 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-PMCA/Cy3-IgG y de 2726 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-NCX/Cy3-IgG.

Estos resultados fueron posteriormente confirmados utilizando un segundo anticuerpo primario para la PMCA y para el NCX, denominados anti-PMCA1/4 y anti-NCX1, obteniéndose con estos anticuerpos una eficiencia de FRET media de  $32 \pm 8\%$  y de  $19 \pm 6\%$ , respectivamente (Fig. 4.1.24 – panel II y III y tabla 4.1). El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1181 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-PMCA1/4/Cy3-IgG y de 1903 para el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-NCX1/Cy3-IgG. Una vez más para estos pares se observó una distorsión significativa de la distribución Gaussiana de la intensidad de fluorescencia por píxel, más fuertemente en las imágenes de fluorescencia roja. Sin



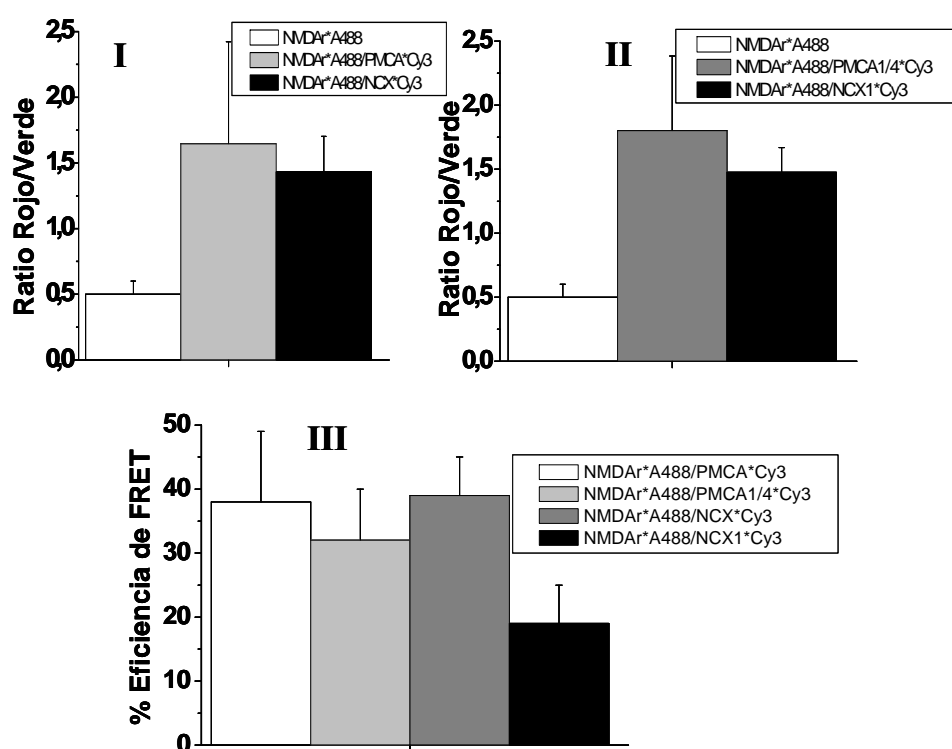
embargo, estas eficiencias de FRET son ligeramente inferiores que las obtenidas para pares FRET utilizados para estudiar la proximidad entre el NMDAr y el L-VOCC, y esto indica que tanto la PMCA como el NCX están separados del NMDAr por algunos nanómetros más que el L-VOCC. Pero sin duda son más significativos los indicios de heterogeneidad de sus distribuciones alrededor del NMDAr, lo que sugiere que solamente una fracción de estas proteínas esta muy próxima al NMDAr.



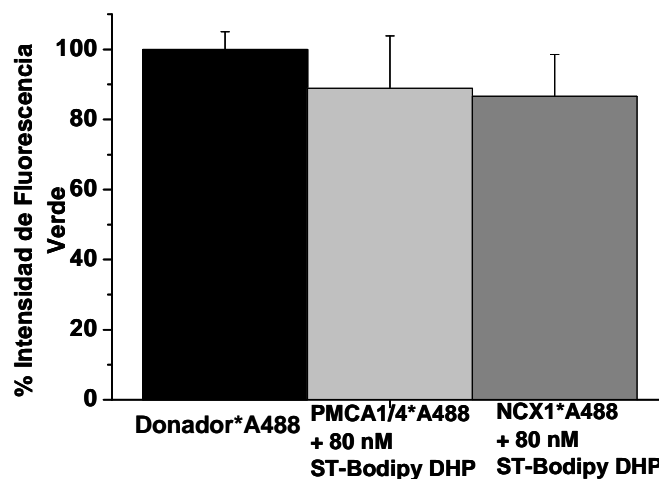
**Figura 4.1.23** – Colocalización del NMDAr con la PMCA (I) y con el NCX (II): Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-NMDAr (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-NMDAr/Alexa488-IgG y anti-PMCA y anti-NCX (dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan el combinado de imágenes de contraste de fase (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0.5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s.



Es importante notar que, en los casos de FRET del anti-PMCA1/4//Alexa488-IgG y del anti-NCX1/Alexa488-IgG8 hacia el ligando del L-VOCC fluorescente, el ST-bodipy dihidropiridina (ST-bodipy DHP) nuestros resultados indican como máximo una débil eficiencia de FRET ( $\leq 10\%$ ) (Fig. 4.1.25), un valor que teniendo en cuenta la magnitud de los errores experimentales en estas medidas no podemos considerar significativo. Por consiguiente, nuestros resultados indican que la PMCA y el NCX están separados de los L-VOCC por una distancia  $\geq 50$  nm, teniendo en consideración que esta es la máxima distancia de FRET detectable con un par formado por un anticuerpo marcado con Alexa488 como donador y ST-bodipy DHP como aceptor.



**Figura 4.1.24** - Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia. Existencia de FRET entre los pares compuestos por anti-NMDAr/anti-PMCA y anti-NMDAr/anti-NCX (I y III) y entre los pares compuestos por anti-NMDAr/anti-PMCA1/4 y anti-NMDAr/anti-NCX1 (II y III). Panel I y II - Incremento en la ratio rojo/verde para todos los pares indicados marcados con los anticuerpos fluorescentes (A488-IgG/Cy3-IgG). Panel III - Eficiencia promedio de FRET para todos los pares indicados marcados con los anticuerpos fluorescentes (A488-IgG/Cy3-IgG).



**Figura 4.1.25** - Análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia. La disminución de la intensidad de la fluorescencia del donador (fluorescencia verde representada en el eje de las ordenadas) no es estadísticamente significativa, lo que demuestra que no hay existencia de FRET entre los pares compuestos por anti-PMCA1/4/A488-IgG o el anti-NCX1/A488-IgG como donador y el ST-Bodipy DHP como aceptor.

**Tabla 4.1** – Resumen de la eficiencia de FRET entre los pares donador/aceptor utilizados en este apartado de “Resultados”. El asterisco (\*) después del anticuerpo primario significa que el anticuerpo primario fue marcado con el anticuerpo secundario Alexa488-IgG (donador de FRET) o con el anticuerpo secundario Cy3-IgG (aceptor de FRET).

Par Donador//Aceptor	% Eficiencia de FRET	Incremento de la ratio de fluorescencia Rojo/Verde
anti-NMDAr*//CTB-Alexa555	66 ± 9	
anti-LVOCC*//anti-NMDAr*	64 ± 6	9,6 ± 2,2
DM-Bodipy Dihidropiridina//CTB-Alexa555	62 ± 10	
anti-LVOCC*//anti-Cav1 *	55 ± 6	4,5 ± 1,2
anti-NMDAr*//ST-Bodipy Dihidropiridina	49 ± 5	
anti-NMDAr*//anti-Cav1 *	49 ± 6	4,2 ± 1,0
anti-PMCA1/4*//anti-Cav2*	48 ± 6	3,4 ± 0,5
anti-PMCA1/4*//anti-Flotillina*	46 ± 5	4,1 ± 0,4
anti-NCX1*//anti-Cav2*	46 ± 7	3,0 ± 0,5
anti-PMCA*//anti-Flotillina*	45 ± 4	4,1 ± 0,5
anti-LVOCC*//anti-Cav2*	44 ± 6	4,4 ± 1,2
anti-PMCA*//anti-Cav2*	44 ± 6	3,4 ± 0,5
anti-NMDAr//anti-NCX*	39 ± 6	3,0 ± 0,3
anti-NCX*//anti-Cav2*	39 ± 6	2,4 ± 0,5
anti-NMDAr*//anti-PMCA*	38 ± 11	3,4 ± 1,3
anti-NMDAr*//anti-Cav2*	35 ± 8	2,0 ± 0,5
anti-NCX*//anti-Flotillina*	32 ± 6	2,7 ± 0,5
anti-NMDAr*//anti-PMCA1/4*	32 ± 8	3,6 ± 0,6
anti-PMCA1/4*//anti-Cav1 *	30 ± 5	2,5 ± 0,2
anti-NCX1*//anti-Flotillina*	29 ± 6	2,5 ± 0,6
anti-NMDAr*//anti-Flotillina*	29 ± 7	2,0 ± 0,4
anti-NMDAr*//anti-NCX1 *	19 ± 6	3,1 ± 0,3
<b>Pares donador/aceptor sin porcentaje de eficiencia de FRET significativa indicando que están separados por más de 80 nm.</b>		<b>Pares donador/aceptor sin porcentaje de eficiencia de FRET significativa indicando que están separados por más de 50 nm.</b>
anti-PMCA1/4*//anti-NCX*		anti-NCX*//ST-Bodipy-Dihidropiridina
anti-PMCA1/4*//anti-NCX1 *		anti-NCX1*//ST-Bodipy-Dihidropiridina

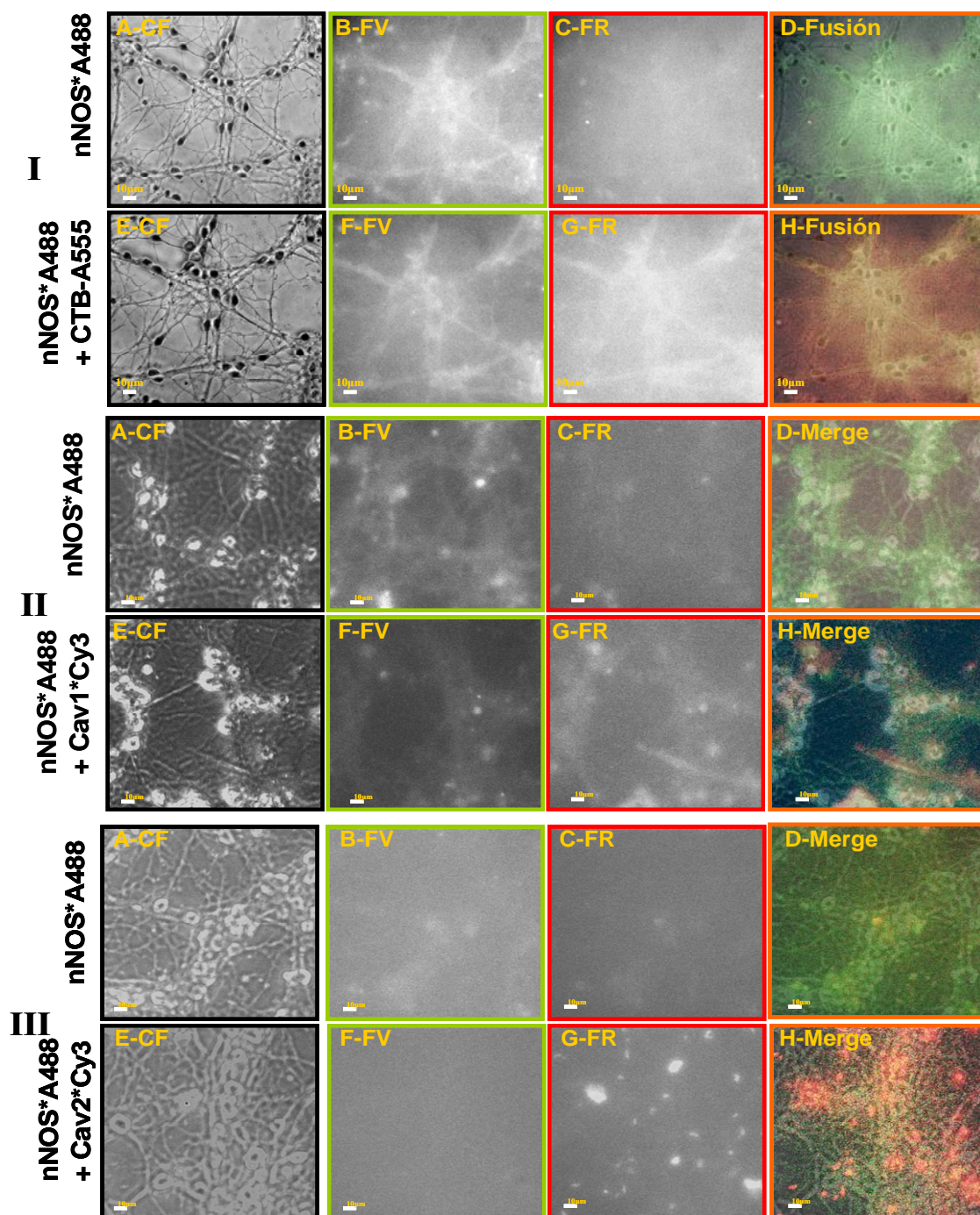


## 4.2. Sistemas redox presentes en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la *Cb<sub>5</sub>R* esta asociada a los microdominios de los *rafts* lipídicos de las CGN maduras en cultivo dónde se promueve una amplia fracción de producción del anión superóxido cerca de este compartimento subcelular (Samhan-Arias *et al.*, 2009), un evento temprano que tiene un papel importante en la apoptosis de las CGN inducida por bajos niveles de  $K^+$  extracelular (Martin-Romero *et al.*, 2002b; Samhan-Arias *et al.*, 2004; Samhan-Arias *et al.*, 2012). Considerando, por un lado, las fuertes implicaciones de la proximidad de la nNOS con los sistemas de producción del anión superóxido para la producción focalizada de peroxinitrito, un oxidante celular altamente tóxico y de bajo tiempo de vida que media la neurodegeneración en situaciones de isquemia-reperfusión, inflamación y enfermedades neurodegenerativas (Iadecola, 1997; van der Veen *et al.*, 1997; Beal, 2000; Bao y Liu, 2002; van Damme *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2006), y por otro lado su presencia en los *rafts* lipídicos aislados de las CGN (sección 4.1.1 de los “Resultados” de esta Tesis Doctoral), hemos estudiado (1) la posible presencia o no de la nNOS en los submicrodominios monitorizados por FRET asociados a los *rafts* lipídicos y (2) el intervalo de proximidad dentro de la distancia de FRET entre la nNOS y la *Cb<sub>5</sub>R*.

### 4.2.1. – La nNOS está presente en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos que son monitorizados con FRET en las CGN.

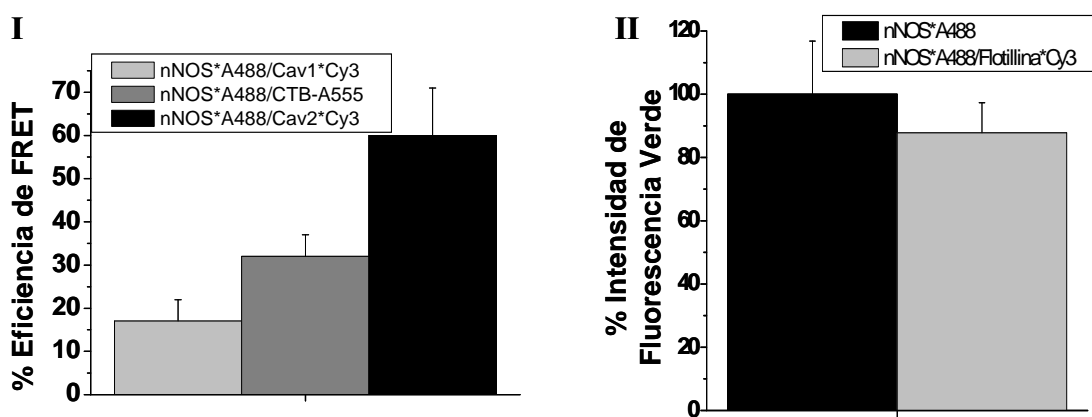
La co-localización de nNOS con las proteínas asociadas a *rafts* lipídicos dentro de la distancia de FRET ha sido confirmada por las imágenes de microscopía de fluorescencia. En la figura 4.2.1 se presentan imágenes seleccionadas y representativas de las obtenidas en los experimentos de imágenes de FRET utilizando el anti-nNOS/Alexa488-IgG como donador y como aceptor el CTB-Alexa555, anti-caveolina-1/Cy3-IgG o anti-caveolina-2/Cy3-IgG. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 2065 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y CTB-A555, de 1747 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG y de 1143 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG.



**Figura 4.2.1** – Colocalización de la nNOS con la CTB-A555 (I), con la caveolina-1 (II) y con la caveolina-2 (III): Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-nNOS (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1, -2 (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) y CTB-A555 (0,5 µg/ml) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de imágenes de contraste de fase (CF) con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms.

El porcentaje de la extinción de fluorescencia del donador cambia con los diferentes pares (Fig. 4.2.2 – panel I), desde una eficiencia de FRET de un 16 % hasta el 60 %. La eficiencia de FRET del par anti-nNOS/Alexa488-IgG como donador para el anti-caveolina-1/IgGCy3 es menor que la eficiencia de FRET del anti-nNOS/Alexa488-IgG como donador para el anti-caveolina-2/Cy3-IgG, indicando una distancia menor de acercamiento para el par nNOS/caveolina-2 que para el par nNOS/caveolina-1. Por el contrario, la menor eficiencia de FRET del anti-nNOS/Alexa488-IgG como donador para la CTB-Alexa555 con respecto a la anti-caveolina-2/Cy3-IgG como aceptor puede ser racionalizado, al menos en parte, por la localización extracelular de los sitios de unión de la CTB en la membrana plasmática, ya que la nNOS es una proteína del espacio intracelular.

A pesar de que no se ha observado una eficiencia significativa de FRET entre el par nNOS/IgGAlexa488/anti-flotillina/Cy3-IgG (Fig. 4.2.2 – panel II), tomado en conjunto todos estos resultados indican que la nNOS se encuentra ampliamente unida a los sub-microdominios descritos en los apartados anteriores del capítulo de “Resultados” de esta Tesis Doctoral asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de las CGN maduras en cultivo e indican una partición preferencial más próxima a la caveolina-2 que a la caveolina-1 en la malla del citoesqueleto.



**Figura 4.2.2** – La nNOS esta dentro del intervalo de distancias de FRET con respecto a la CTB-Alexa555 (CTB-A555), a las caveolinas-1 y -2 (I) pero no con la flotillita (II): Panel I - El análisis cuantitativo de FRET de las imágenes de fluorescencia entre los pares formados por anti-nNOS/IgGAlexa488 (nNOS\*A488) y la CTB-A555, nNOS\*A488 y anti-caveolina-1/IgGCy3 (Cav1\*Cy3) o nNOS\*A488 y anti-caveolina-2/IgGCy3 (Cav2\*Cy3) se representa mediante la eficiencia promedio de FRET para cada par. Panel II - La ausencia de una caída estadísticamente significativa en la fluorescencia verde para el par nNOS\*A488 y anti-

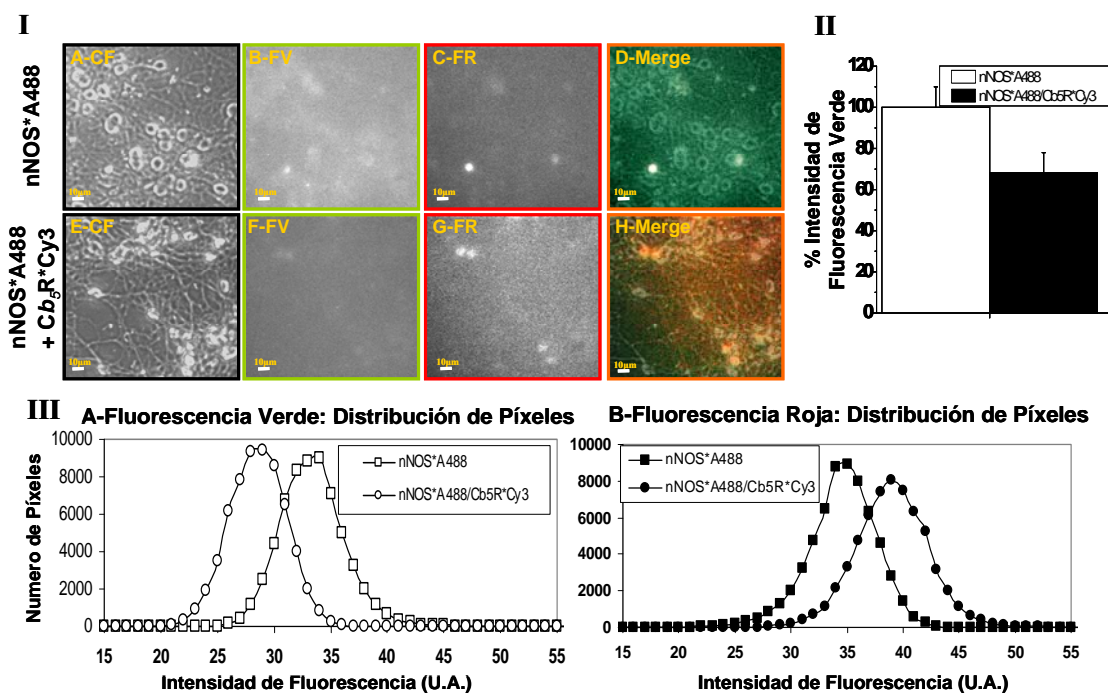
flotillina/IgGCy3 (Flotillina\*Cy3) pone de manifiesto que la existencia de FRET para este par es cuestionable o en todo caso muy débil.

En la tabla 4.2 (localizada en la página final de esta sección de los resultados) se presentan los parámetros más relevantes resultantes del análisis de la eficiencia de FRET para los diferentes pares estudiados utilizando anti-nNOS/IgGAlexa488 como donador y diferentes marcadores de los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos como aceptores.

### 4.2.2. – La $Cb_5R$ está dentro de la distancia de FRET con la nNOS.

Para explorar si la nNOS y la  $Cb_5R$  se encuentran dentro de la distancia de FRET y su proximidad se han utilizado los anticuerpos primarios para ambas proteínas (anti-nNOS y anti- $Cb_5R$ ) conjugados con los anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa488-IgG y Cy3-IgG) correspondientes (Fig. 4.2.3 – panel I). La observación directa de los somas neuronales en las imágenes de fusión de las imágenes de intensidad de fluorescencia roja y verde (*merge*), así como el análisis de píxeles de estas imágenes muestra la existencia de FRET entre la sonda Alexa488-IgG y la sonda Cy3-IgG. La eficiencia promedio de FRET para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG//anti- $Cb_5R$ /Cy3-IgG determinada a partir del análisis de los resultados obtenidos es del  $32\pm 10\%$  (Fig. 4.2.3 – panel II), un valor menor que el obtenido para los pares de FRET utilizados en el estudio de la proximidad entre las proteínas NMDAr y L-VOCC, pero mayor que el obtenido con el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG//anti-PMCA/Cy3-IgG (Fig. 4.1.24 y tabla 4.2). Además, debe notarse que en el caso del par nNOS/ $Cb_5R$  en las imágenes analizadas la extinción de la fluorescencia verde no condujo a distorsiones significativas de la forma Gaussiana en la distribución de la intensidad de fluorescencia por píxel en los somas neuronales, ni tampoco en la distribución de píxeles en función de la intensidad de fluorescencia roja (Fig. 4.2.3 – panel III). Por tanto, nuestros resultados sugieren fuertemente que los sub-microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática son puntos de generación de estrés oxidativo focalizado debido a la producción de peroxinitrito cuando se produce la estimulación de la producción del anión superóxido por la  $Cb_5R$ . El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1314 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti- $Cb_5R$ /Cy3-IgG.





**Figura 4.2.3** – Colocalización de la nNOS con la Cb<sub>5</sub>R: Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-nNOS (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (Imágenes A-D) o anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-Cb<sub>5</sub>R (DIA-1:dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms. Panel II - El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia del par compuesto por la nNOS y la Cb<sub>5</sub>R indica la existencia de FRET y se muestra por la caída del porcentaje de intensidad de fluorescencia en presencia del donador y del aceptor (anti-nNOS/Alexa488-IgG con el anti-Cb<sub>5</sub>R/Cy3-IgG). Panel III - Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el par nNOS y Cb<sub>5</sub>R. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

**Tabla 4.2** – Resumen de la eficiencia de FRET entre los pares donador/aceptor utilizados en esta sección de los resultados. El asterisco (\*) después del anticuerpo primario significa que el anticuerpo primario fue marcado con el anticuerpo secundario Alexa488-IgG (donador de FRET) o con el anticuerpo secundario Cy3-IgG (aceptor de FRET).

<b>Par Donador//Aceptor</b>	<b>% Eficiencia de FRET</b>	<b>Incremento de la ratio de fluorescencia Rojo/Verde</b>
anti-nNOS*//anti-Cav2*	60 ± 11	7,0 ± 3,0
anti-nNOS*//CTB-Alexa555	32 ± 5	
anti-nNOS*//anti-Cav1*	17 ± 5	3,1 ± 1,2
anti-nNOS*//anti-Cb <sub>5</sub> R*	32 ± 10	5,2 ± 1,1
<b>Pares donador/aceptor sin porcentaje de eficiencia de FRET significativa indicando que están separados por más de 80 nm.</b>		
anti-nNOS*//anti-Flotillina*		

### 4.3. Co-localización de los sistemas de transporte de calcio y de los sistemas redox asociados a los *rafts* lipídicos dentro de la distancia de FRET en las neuronas granulares del cerebelo.

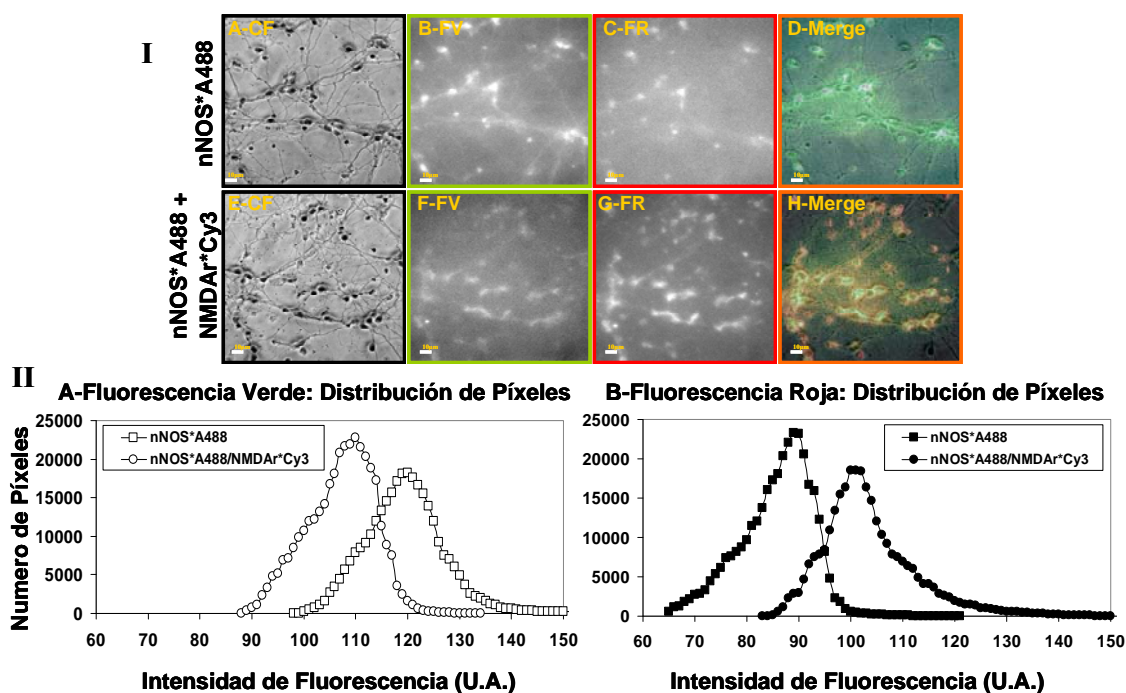
Numerosas evidencias experimentales subrayan la asociación de estrés oxidativo por sobreproducción de especies reactivas de oxígeno con la desregulación sostenida de la homeostasis del calcio citosólico neuronal. Un ejemplo claro es la síntesis del óxido nítrico ( $\text{*NO}$ ) por la nNOS tras la activación del NMDAr, ya que la subida transitoria en la concentración de calcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  promueve la unión de este ión a la calmodulina y la subsiguiente activación de la nNOS por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Knowles y Moncada, 1994). Por otra parte, la proximidad entre los dos sistemas, nNOS y NMDAr, permitiría una más rápida y eficiente coordinación de las respuestas de ambas vías de señalización intracelular. Por esta razón, hemos cuestionado experimentalmente si la nNOS se encuentra en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos en las CGN maduras en cultivo dentro del intervalo de distancias que permiten un eficiente FRET con los principales sistemas de control de la homeostasis del calcio citosólico neuronal.

#### 4.3.1. nNOS está dentro de la distancia de FRET con el NMDAr, L-VOCC y PMCA, pero no con el NCX.

La asociación de la nNOS con los dominios PDZ de proteínas ligadas al citoesqueleto neuronal ha sido bien establecida (Brenman y Bredt, 1997). Como el NMDAr también se liga a las proteínas conteniendo el dominio PDZ (Prybylowski *et al.*, 2005), sería de esperar que la nNOS estuviera unida al citoesqueleto cerca del NMDAr.

En la figura 4.3.1 se presentan imágenes de microscopia de fluorescencia seleccionadas con la doble tinción anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-NMDAr/Cy3-IgG. Tanto la observación directa de las imágenes de fusión de las imágenes de intensidad de fluorescencia roja y verde, como el análisis de intensidad de píxeles de los somas neuronales demuestran la existencia de FRET significativo entre los anticuerpos marcados con Alexa488-IgG y Cy3-IgG. Por otra parte, el fuerte desplazamiento de la distribución Gaussiana de píxeles para valores menores y mayores de intensidad de

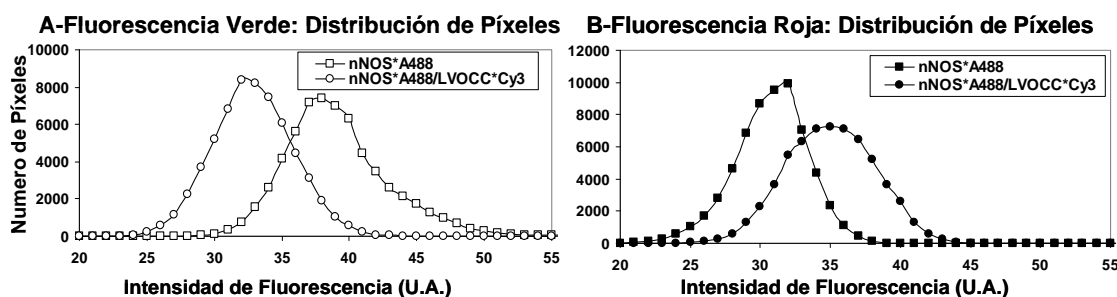
fluorescencia verde y roja, respectivamente (Fig. 4.3.1 – panel II), pone de manifiesto que la extinción de la fluorescencia verde se correlaciona con el incremento de la fluorescencia roja y demuestra una extensiva co-localización de la nNOS y del NMDAr dentro de una distancia a la cual corresponde una eficiencia de FRET de  $46 \pm 5\%$  (Fig.4.3.4).



**Figura 4.3.1** – Colocalización de la nNOS con el NMDAr: Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-nNOS (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (Imágenes A-D) o anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-NMDAr (dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s. Panel II - Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el par nNOS y NMDAr. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

La estrecha proximidad entre el L-VOCC y el NMDAr, demostrada anteriormente, permite predecir la existencia de FRET entre el anti-nNOS/Alexa488-IgG y el anti-L-VOCC/Cy3-IgG, una posibilidad que fue confirmada experimentalmente como se puede observar en el análisis de las intensidades de píxeles (Fig. 4.3.2). El cálculo de la eficiencia de FRET promedio de este par a partir de la extinción de la fluorescencia verde permite concluir que la nNOS esta más cerca del

NMDAr que de los L-VOCC, como se deriva de la comparación de los valores de eficiencia de FRET obtenidos para ambos pares de proteínas marcadas con los anticuerpos fluorescentes precitados [tabla 4.3 (localizada al final del apartado 4.3.2 de esta sección de los resultados)]. Es de destacar que en ambos casos (nNOS/NMDAr y nNOS/L-VOCC) la eficiencia de FRET es menor que la obtenida en el caso del par NMDAr/L-VOCC (demostrado anteriormente). También debe reseñarse que en todos estos casos analizados la extinción de la fluorescencia verde no conduce a distorsiones significativas en la forma Gaussiana de la distribución de píxeles en función de la intensidad de la fluorescencia verde analizados, ni tampoco en la distribución de píxeles en función de la intensidad de la fluorescencia roja (Fig. 4.1.9 – panel II, 4.3.1 – panel II y 4.3.2).

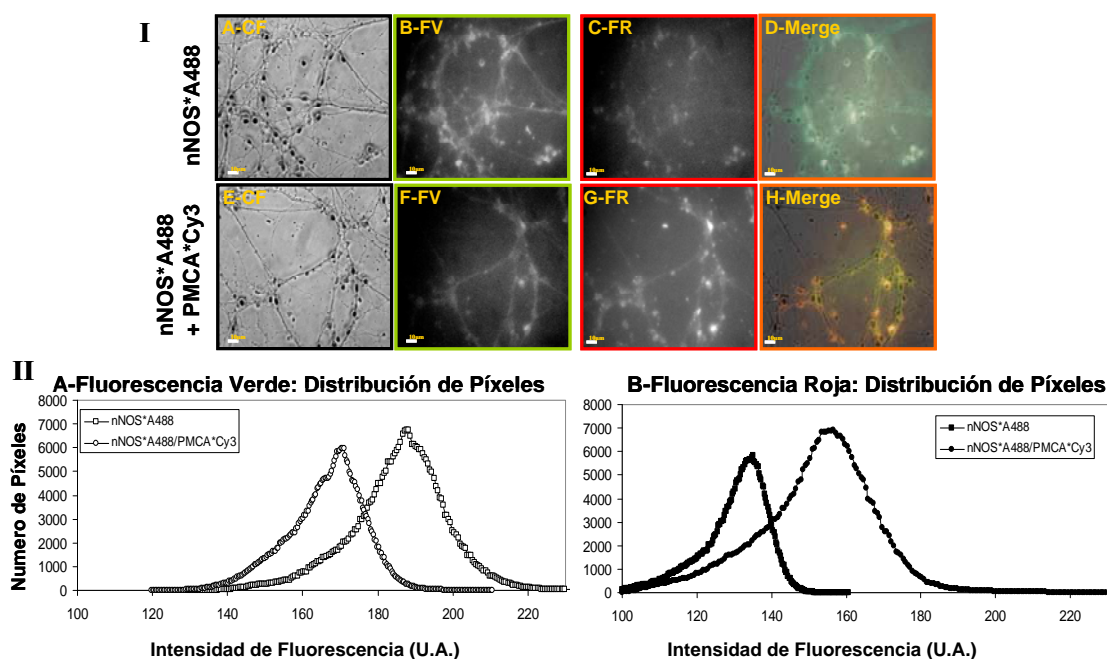


**Figura 4.3.2** – Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el par nNOS y L-VOCC. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

Estos datos demuestran una extensa co-localización de estas proteínas (nNOS, NMDAr y L-VOCC) en submicrodominios de un tamaño inferior a  $0,1 \mu\text{m}$  asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de las CGN maduras *in vitro*. Asimismo, estos resultados indican una menor proximidad entre la nNOS y el NMDAr o el L-VOCC que entre el NMDAr y el L-VOCC. Por otra parte, es importante tener en consideración que tan sólo unos pocos de nm de diferencia en la distancia entre estas proteínas son suficientes para explicar la diferencia observada en la extinción de la sonda fluorescente que actúa como donador. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1624 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-NMDAr/Cy3-IgG y de 1045 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-L-VOCC/Cy3-IgG.

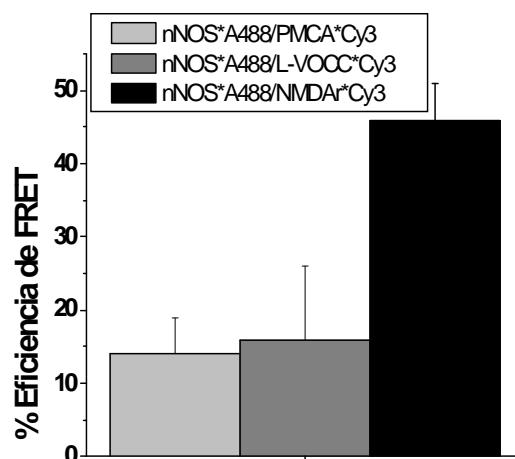
En la figura 4.3.3 se presentan imágenes representativas de las imágenes de microscopia de fluorescencia obtenidas para las CGN con doble tinción con el donador

anti-nNOS/Alexa488-IgG y con el aceptor anti-PMCA/Cy3-IgG. La eficiencia de FRET calculada para la extinción del donador de fluorescencia verde es de  $14 \pm 5\%$ , un valor similar al obtenido para el par anti-nNOS/IgGAlexa488//anti-L-VOCC/Cy3-IgG (Fig. 4.3.4 y tabla 4.3). Sin embargo, el análisis de las imágenes de fluorescencia muestra una fuerte distorsión de la distribución Gaussiana de los píxeles en función de la intensidad de la fluorescencia roja en el par anti-nNOS/IgGAlexa488//anti-PMCA/Cy3-IgG (Fig. 4.3.3 – panel II), lo que indica heterogeneidad en la distribución espacial en este caso. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 2050 para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-PMCA/Cy3-IgG.

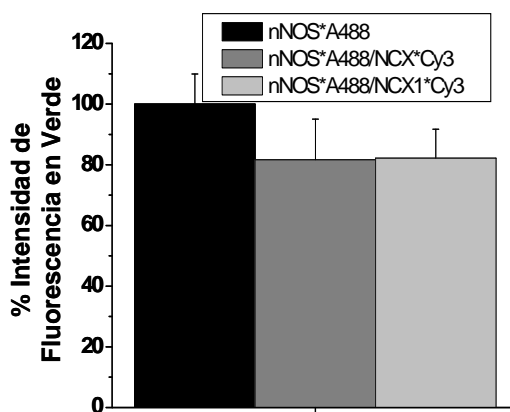


**Figura 4.3.3** – Colocalización de la nNOS con la PMCA: Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-nNOS (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (Imágenes A-D) o anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-PMCA (dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor), en color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s. Panel II - Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el par nNOS y PMCA. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

Por el contrario, para los pares anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-NCX/Cy3-IgG o anti-NCX1/Cy3-IgG no fue detectada la existencia de FRET significativa, lo que indica que la nNOS está separada del NCX por una distancia mayor que 80 nm (Fig. 4.3.5).



**Figura 4.3.4** – El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia de los pares formados por anti-nNOS/IgGAlexa488 (nNOS\*A488) y anti-PMCA/IgGCy3 (PMCA\*Cy3) o anti-L-VOCC/IgGCy3 (L-VOCC\*Cy3) o anti-NMDAr/IgGCy3 (NMDAr\*Cy3) indica la existencia de FRET y se muestra por el porcentaje de eficiencia de FRET entre el donador y aceptor (Alexa488-IgG y Cy3-IgG).



**Figura 4.3.5** – El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia de los pares formados por anti-nNOS/IgGAlexa488 (nNOS\*A488) y anti-NCX/IgGCy3 (NCX\*Cy3) o anti-NCX1/IgGCy3 (NCX1\*Cy3) indica que la débil disminución de la fluorescencia del donador (fluorescencia verde) en presencia del aceptor no es estadísticamente significativa, por lo que no se puede concluir que exista FRET en el caso de estos dos pares.

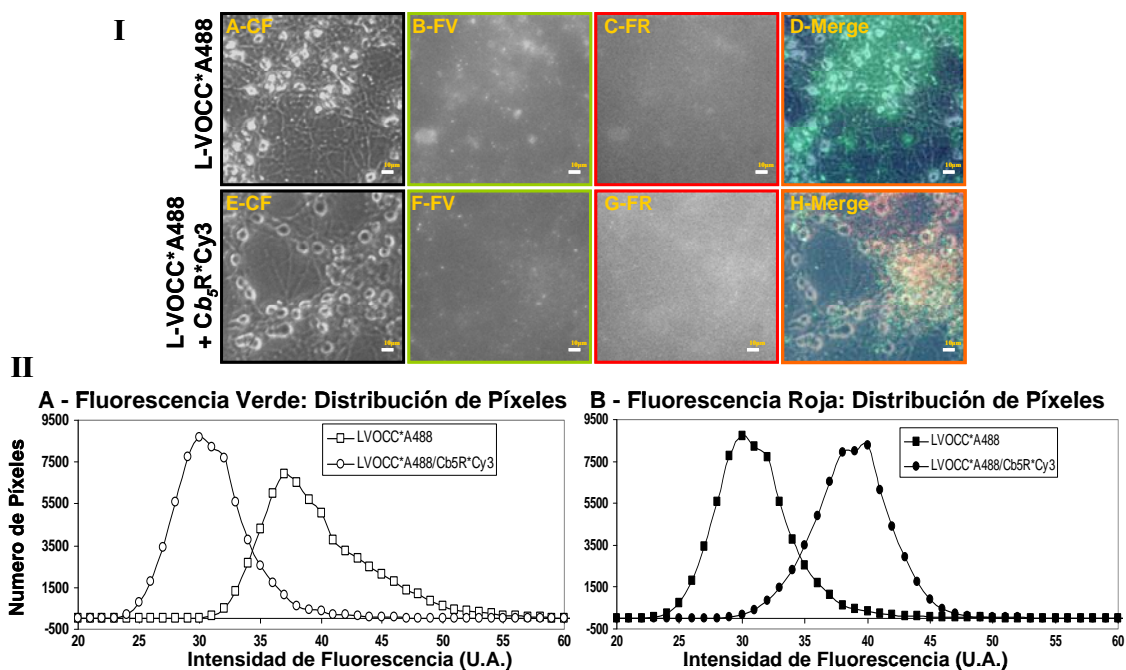
#### 4.3.2. *Cb<sub>5</sub>R* está dentro de la distancia de FRET con el L-VOCC, pero no con la PMCA.

La partición de la *Cb<sub>5</sub>R* en microdominios proteicos asociados a los *rafts* lipídicos ha sido demostrada en trabajos previos de nuestro laboratorio (Samhan-Arias *et al.*, 2009) y, como ha sido mostrado previamente en este trabajo, una amplia fracción de esta proteína se encuentra asociada a los *rafts* lipídicos purificados a partir de las CGN maduras en cultivo (Fig. 4.1.3).

Las imágenes de microscopía de fluorescencia de las CGN con doble tinción con anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-*Cb<sub>5</sub>R*/Cy3-IgG han sido obtenidas utilizando un filtro de excitación de 470 nm, es decir, en condiciones en las que la excitación directa del fluoróforo Cy3 es despreciable como se ha indicado anteriormente. Las imágenes de intensidad de fluorescencia mostraron una extensa co-localización de los anticuerpos marcados con Alexa488 (donador) y Cy3 (aceptor), como se muestra en la figura 4.3.6, sugiriendo por tanto la existencia de una eficiencia de FRET significativa entre las sondas fluorescentes Alexa488 y Cy3. Los resultados obtenidos de un total de  $n > 6$  placas de tres preparaciones distintas, analizando 3-4 campos seleccionados de cada placa, se acumularon hasta disponer de los datos de más de 1000 somas neuronales y estos fueron sometidos a análisis detallado de la distribución de intensidad de fluorescencia por píxel (Fig. 4.3.6 – panel II). Los datos mostrados en esta figura demuestran que la doble tinción de las CGN produce un fuerte desplazamiento del histograma de la fluorescencia verde hacia valores de menor intensidad que los obtenidos cuando se realiza la tinción de las CGN sólo con anti-L-VOCC/Alexa488-IgG, resultando en una clara disminución del valor promedio de la intensidad de fluorescencia por píxel, un hecho que se correlaciona con el desplazamiento del histograma de la fluorescencia roja hacia valores de mayor intensidad y mayor valor promedio de la intensidad de fluorescencia. Por tanto, el análisis de píxeles de los somas neuronales confirmó la existencia de una eficiencia de FRET significativa cuando se realiza la tinción de los L-VOCC y las *Cb<sub>5</sub>R* con el complejo de anticuerpos marcados con las sondas fluorescentes Alexa488 y Cy3. Los resultados nos han permitido calcular una eficiencia de FRET del  $32 \pm 8 \%$ , a partir de la extinción promedio de la fluorescencia verde por píxel en el soma neuronal en este caso. La existencia de una eficiencia de FRET significativa se ve apoyada también por el incremento de la relación entre la intensidad promedio por píxel de las fluorescencias roja y verde (ratio FR/FV),



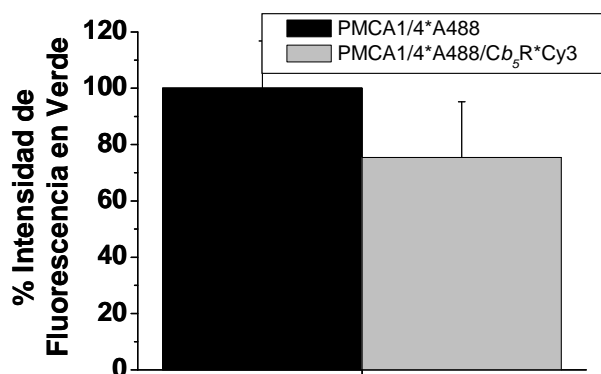
desde  $0,41 \pm 0,15$  para las CGN teñidas sólo con el donador anti-L-VOCC/Alexa488-IgG hasta  $0,98 \pm 0,23$  para las CGN con doble tinción por el mismo donador y el aceptor anti- $Cb_5R$ /Cy3-IgG. El número total de somas neuronales seleccionados para el análisis fue de 1001 para el par anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti- $Cb_5R$ /Cy3-IgG.



**Figura 4.3.6** – Colocalización del L-VOCC con la  $Cb_5R$ : Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-L-VOCC (dilución 1:25)/Alexa488-IgG (Imágenes A-D) o con el anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti- $Cb_5R$  (DIA-1-dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor). En color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms. Panel II - Histogramas de la distribución de la intensidad de fluorescencia de píxeles de las imágenes analizadas para el par L-VOCC y  $Cb_5R$ . La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

La PMCA, presente también en los sub-microdominios de *rafts* lipídicos (descrito anteriormente), se inhibe por exposición al peroxinitrito (Zaidi y Michaelis, 1999; Gutierrez-Martin *et al.*, 2002; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005), que es generado a partir del anión superóxido. Por consiguiente, su proximidad con la  $Cb_5R$  es de extrema relevancia por sus implicaciones funcionales para la PMCA. Nuestros resultados

permiten concluir que estas dos proteínas están separadas por una distancia mayor que 80 nm dentro de los microdominios en los *rafts* lipídicos, porque en el análisis de las imágenes de microscopía de fluorescencia no se ha observado una extinción estadísticamente significativa en la fluorescencia verde del donador y, por tanto, no se obtuvo una eficiencia de FRET significativa utilizando los pares anti-PMCA1/4/Alexa488-IgG y anti-*Cb*<sub>5</sub>R/Cy3-IgG (Fig. 4.3.7).



**Figura 4.3.7** – El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia del par formado por anti-PMCA1/4/IgGAlexa488 (PMCA1/4\*A488) y anti-*Cb*<sub>5</sub>R/IgGCy3 (*Cb*<sub>5</sub>R\*Cy3) indica que no la existencia de FRET en este caso es cuestionable, porque la débil caída en el porcentaje de intensidad de fluorescencia del donador (fluorescencia verde) en presencia del aceptor no es estadísticamente significativa.

**Tabla 4.3** – Resumen de la eficiencia de FRET entre los pares donador/aceptor utilizados en esta sección de los resultados. El asterisco (\*) después del anticuerpo primario significa que el anticuerpo primario fue marcado con el anticuerpo secundario Alexa488-IgG (donador de FRET) o con el anticuerpo secundario Cy3-IgG (aceptor de FRET).

Par Donador//Aceptor	% Eficiencia de FRET	Incremento de la ratio de fluorescencia Rojo/Verde
anti-nNOS*//anti-NMDAr*	46 ± 5	3,3 ± 0,3
anti-LVOCC*//anti- <i>Cb</i> <sub>5</sub> R*	32 ± 8	2,4 ± 0,2
anti-nNOS*//anti-LVOCC*	16 ± 10	2,0 ± 0,7
anti-nNOS*//anti-PMCA*	14 ± 5	2,4 ± 0,3
<b>Pares donador/aceptor sin porcentaje de eficiencia de FRET significativa indicando que están separados por más de 80 nm.</b>		
anti-nNOS*//anti-NCX*		
anti-nNOS*//anti-NCX1*		
anti-PMCA1/4*//anti- <i>Cb</i> <sub>5</sub> R*		

### 4.3.3. Inmunoprecipitación de proteínas presentes en los *rafts* lipídicos.

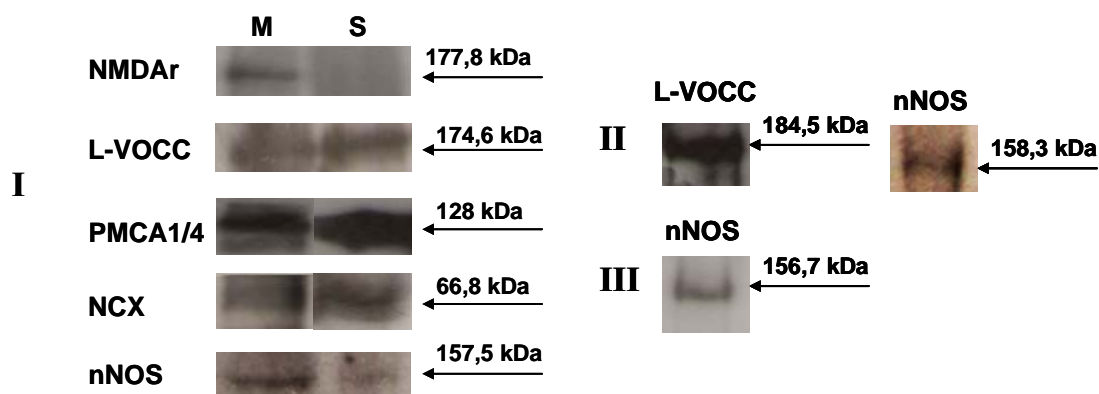
Con el objetivo de evaluar la presencia de complejos proteicos estables en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos y su asociación a la caveolina-1, el marcador principal de *rafts* lipídicos utilizado en este estudio, se ha utilizado la técnica de inmunoprecipitación en presencia de 25 mM M $\beta$ CD con lisados de las neuronas granulares de cerebelo como ha sido descrito en “Materiales y métodos”. Dado que la M $\beta$ CD solubiliza la matriz lipídica de los *rafts* al unir colesterol, con este método hemos evaluado la posibilidad de la formación de complejos proteicos por asociación de proteínas como L-VOCC, NMDAr, PMCA, NCX y nNOS con la caveolina-1. En los geles de electroforesis se han cargado (1) la muestra precipitada con la matriz que llevaba unido el anticuerpo anti-caveolina-1 y (2) una parte alícuota del sobrenadante que contenía la muestra que no se ligó a la matriz.

La figura 4.3.8 - panel I muestra que co-precipitan con la caveolina-1 las siguientes proteínas presentes en los *rafts* lipídicos de las CGN: el NMDAr, el L-VOCC, la PMCA, el NCX y la nNOS. Pero se observan notables diferencias entre los resultados obtenidos para cada una de estas proteínas. Nótese que el NMDAr se liga completamente a la caveolina-1 porque no se observa ninguna banda en la calle del gel donde se ha colocado el sobrenadante, a diferencia de lo que se observa para el L-VOCC, para la PMCA, para el NCX y para la nNOS. Estas proteínas también se ligan a la caveolina-1, pero no totalmente porque la banda de la proteína se observa tanto en la calle correspondiente a la matriz que tiene la caveolina-1 como en la calle del gel donde fue colocado una parte del sobrenadante. Más aún, una vez evaluados los datos para el total del volumen de sobrenadante la proporción de la cantidad de proteína no ligada a la caveolina-1 con respecto a la proteína ligada a la caveolina-1 es de 17:1 para la PMCA, de 9,8:1 para el NCX, de 7,7:1 para el LVOCC y de 3,6:1 para la nNOS.

Otro resultado a destacar es el de inmunoprecipitación utilizando una matriz unida a anti-NMDAr y revelando la membrana con el anti-LVOCC (Fig. 4.3.8 – panel II), ya que la presencia de los L-VOCC en la matriz precipitada junto con la proximidad espacial entre estas proteínas en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos (apartado 4.1.4 de este capítulo de “Resultados”) sugiere fuertemente la existencia de una interacción directa entre ambas proteínas.

Adicionalmente, los experimentos de inmunoprecipitación con la matriz unida al anti-NMDAr ponen de manifiesto la presencia de una banda reactiva contra la nNOS en

los precipitados. La presencia de una banda reactiva contra la nNOS también ha sido observada en los precipitados de la matriz unida al anti-*Cb<sub>5</sub>R* (DIA-1) (Fig. 4.3.8 – panel II y III). Sin embargo, en estos casos los experimentos de FRET indicaron una mayor separación entre la nNOS y estas proteínas (NMDAr y *Cb<sub>5</sub>R*), lo que sugiere que los resultados de inmunoprecipitación reflejan la presencia o complejos multiméricos del citoesqueleto de caveolina-1 con estas proteínas en los precipitados.



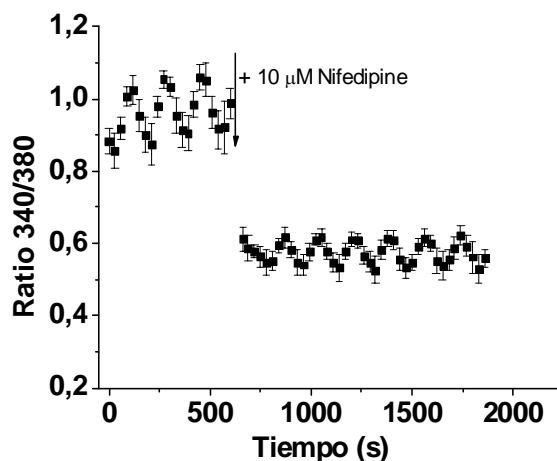
**Figura 4.3.8** – Experimentos de co-inmunoprecipitación realizados como se describe en el capítulo 3.9 de “Materiales y métodos”. Co-inmunoprecipitación de proteínas presentes en los *rafts* lipídicos. Panel I – presencia del NMDAr, L-VOCC, PMCA, NCX y nNOS en la co-inmunoprecipitación con la caveolina-1 en la matriz (M) y del L-VOCC, PMCA, NCX y nNOS en el sobrenadante sin caveolina-1 (S). Panel II – L-VOCC y nNOS co-inmunoprecipitan con el NMDAr. Panel III - nNOS co-inmunoprecipita con la *Cb<sub>5</sub>R*.

#### 4.4. Sistemas más relevantes en la homeostasis de la concentración del calcio intracelular en neuronas granulares del cerebelo.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos sobre el análisis de la relevancia para la homeostasis del calcio citosólico en las CGN de los sistemas de entrada y salida de calcio de la membrana plasmática presentes en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos que han sido descritos en los apartados expuestos previamente. Para tal fin se ha utilizado una gama de inhibidores y antagonistas de estos sistemas ampliamente aceptados y utilizados en estudios funcionales de los mismos. Para medir la  $[Ca^{2+}]_i$  se ha utilizado el fura-2 AM como se ha descrito en el apartado de “Materiales y métodos” en la sección 3.10. Transcurridos 10 minutos del registro de la situación control se añadió a cada placa el inhibidor o antagonista seleccionado y se registró la ratio 340/380 durante más de 20 minutos. Las gráficas representadas son los valores promedio de los obtenidos para las células presentes en una placa representativa de cada condición, teniendo en cuenta que para cada condición se han repetido los experimentos con al menos 3 placas de 3 preparaciones de CGN diferentes (nº de placas analizadas  $\geq 9$ ).

##### 4.4.1. El bloqueo de los canales de tipo L activados por voltaje (L-VOCC) disminuye de manera sostenida la $[Ca^{2+}]_i$ en las CGN en cultivo.

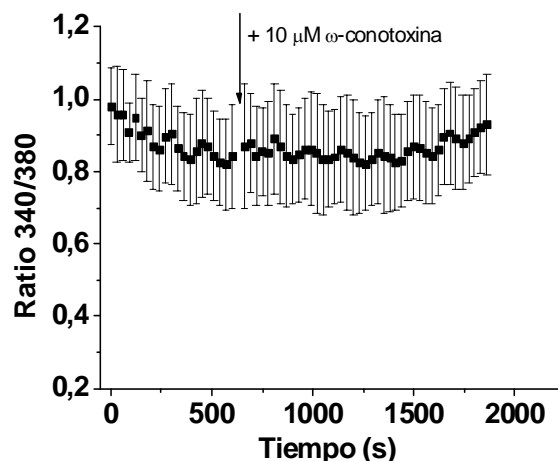
Las dihidropiridinas (DHP) son inhibidores selectivos de los canales de tipo L activados por voltaje (Fox *et al.*, 1987). En este estudio hemos utilizado la nifedipina como bloqueador de los L-VOCC y en la gráfica 4.4.1 se puede observar su efecto en la  $[Ca^{2+}]_i$  de las neuronas granulares de cerebelo en condiciones normales de cultivo. Tras la adición de la nifedipina la ratio 340/380 disminuyó de manera sostenida desde un valor promedio 0,95 hasta un valor promedio de 0,6. Esta disminución indica no sólo que la dihidropiridina en las CGN bloquea fuertemente a la entrada de calcio en las neuronas, sino que además estos canales desempeñan un papel crítico para el mantenimiento del nivel de estado estacionario moderadamente elevado de la concentración del calcio citosólico.



**Gráfica 4.4.1** – La nifedipina, un bloqueador de los L-VOCC disminuye la  $[Ca^{2+}]_i$  en las CGN. Registro cinético de la ratio 340/380 de CGN cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 10  $\mu$ M de nifedipina con inicio de registro a los 660 segundos.

Además de los L-VOCC se ha estudiado el efecto que la inhibición de los canales de tipo N activados por voltaje tiene para la homeostasis del calcio citosólico de las CGN maduras en cultivo. Hemos utilizado para tal fin la  $\omega$ -conotoxina, una toxina de 27 aminoácidos obtenida del caracol marino *conus geographus* descubierta por (McCleskey *et al.*, 1987) por su propiedad de bloquear los canales de calcio tipo N activados por voltaje. Estudios posteriores demostraron que es un inhibidor específico y reversible de los canales de tipo N activados por voltaje (Aosaki y Kasay, 1989; Plummer y Hess, 1991). En la gráfica 4.4.2 puede observarse que la inhibición de estos canales de tipo N no tiene efecto significativo en la homeostasis del calcio citosólico,  $[Ca^{2+}]_i$ , en las condiciones normales de cultivo en las CGN maduras *in vitro*.

Una vez estudiada la inhibición de los canales de calcio activados por voltaje hemos centrado nuestra atención en los NMDAr, el otro sistema importante en la entrada de calcio en las CGN.

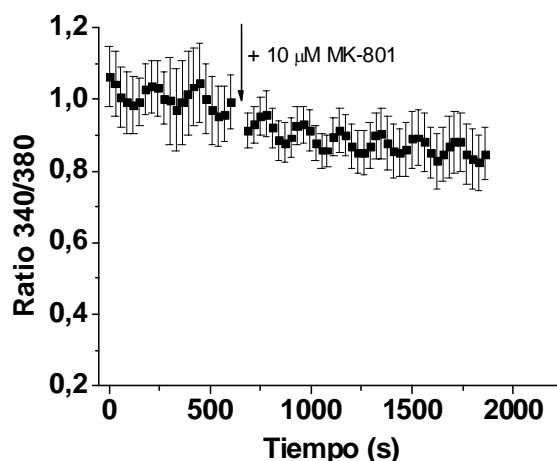


**Gráfica 4.4.2** – La  $\omega$ -conotoxina, un inhibidor específico de los canales de tipo N activados por voltaje, no afecta los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  citosólico en las CGN. Registro cinético de la ratio 340/380 de CGN cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 10  $\mu$ M de  $\omega$ -conotoxina con inicio de registro a los 660 segundos.

#### 4.4.2. El MK-801, un antagonista del NMDAr, tiene un efecto poco relevante en la $[Ca^{2+}]_i$ de las CGN en cultivo.

El (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino maleato (MK-801) es el antagonista no competitivo del NMDAr más utilizado en modelos animales. NMDAr es un receptor ionotrópico del L-glutamato, el principal neurotransmisor excitador del cerebro, cuya activación induce la apertura del canal de calcio de alta conductancia presente en su estructura. El MK-801 se une dentro del canal iónico del receptor, previniendo así el influjo de los iones  $Ca^{2+}$  a través del canal (Coan *et al.*, 1987).

A pesar de que las CGN diferenciadas en cultivo al DIV 8 expresan los NMDAr (Balazs *et al.*, 1988; Bessho *et al.*, 1994; Resink *et al.*, 1995) hay que tener en cuenta que estos receptores tienen una composición de las subunidades aún inmadura (Vallano *et al.*, 1996). Por eso en estos estudios de bloqueo de la entrada de calcio a través de estos receptores se han utilizado las CGN al DIV 10. En la gráfica 4.4.3 se puede observar que tras adicionar el MK-801 los niveles de calcio no han cambiado significativamente, indicando que la entrada de calcio por este receptor en este modelo celular no es muy significativa en condiciones normales de cultivo.



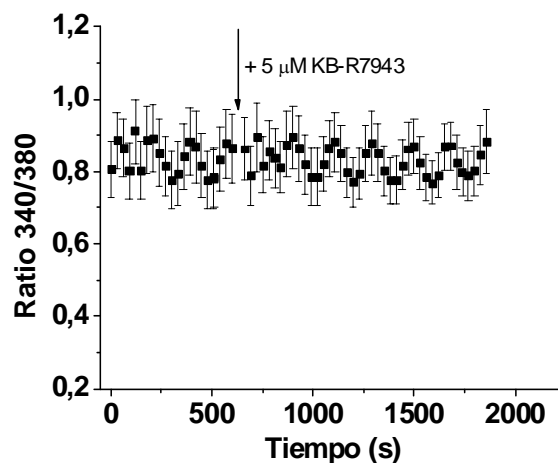
**Gráfica 4.4.3** – El MK-801, un antagonista del NMDAr, disminuye de forma poco relevante la  $[Ca^{2+}]_i$  en las CGN. Registro cinético de la ratio 340/380 de CGNs cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 10  $\mu$ M de MK-801 con inicio de registro a los 660 segundos.

#### 4.4.3. La PMCA es el sistema de salida de calcio de la membrana plasmática más relevante en las CGN en cultivo.

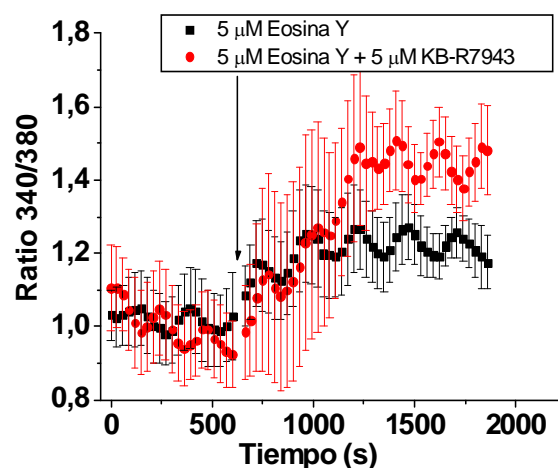
Después de analizar el efecto de bloqueo en los sistemas de entrada de calcio en las neuronas granulares de cerebelo procedimos a analizar el peso relativo de los sistemas de salida de calcio de la membrana plasmática de las CGN para la homeostasis del  $[Ca^{2+}]_i$ . Para tal fin se han utilizado el KB-R7943 y la eosina Y, inhibidores del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) y de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), respectivamente.

La inhibición de la PMCA tiene un papel más fuerte en la subida de la  $[Ca^{2+}]_i$  que la inhibición del NCX como se deriva de los resultados obtenidos en nuestro estudio y presentados en la gráfica 4.4.4 y 4.4.5. Más aún, en las condiciones normales del cultivo de las CGN utilizadas en este estudio la inhibición del NCX no parece tener un efecto significativo a corto plazo sobre la homeostasis del calcio citosólico, ya que no parece favorecer la subida del calcio intracelular. Sin embargo, en la gráfica 4.4.5 se puede observar que cuando estos dos bloqueantes son añadidos de manera simultánea a la placa el efecto de la eosina Y se refuerza por la presencia de KB-R7943, provocando una más potente desregulación de la homeostasis del calcio citosólico, como lo evidencia una mayor subida sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$ .





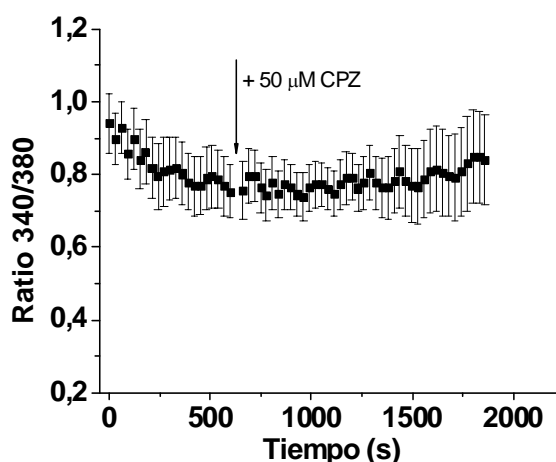
**Gráfica 4.4.4** – El KB-R7943, un inhibidor del NCX no afecta los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  en las CGN. Registro cinético de la ratio 340/380 de CGNs cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 5 μM de KB-R7943 con inicio de registro a los 660 segundos.



**Gráfica 4.4.5** - La eosina Y, un inhibidor de la PMCA, incrementa los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  en las CGN y este efecto se ve potenciado por la presencia de KB-R7943. Registro cinético de la ratio 340/380 de las CGNs cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 5 μM de Eosina Y (círculos negros) ó 5 μM de Eosina Y con 5 μM de KB-R7943 (círculos rojos) con inicio de registro a los 660 segundos.

#### 4.4.4. El bloqueo de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA) no altera significativamente a corto plazo la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las CGN en cultivo.

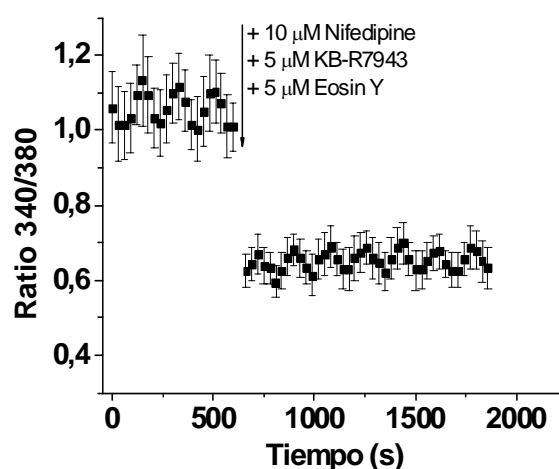
Para cuestionar el papel de las reservas intracelulares de calcio en la homeostasis del calcio citosólico se han determinado los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tras tratamiento de las CGN con un inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA). El inhibidor utilizado fue el ácido ciclopiazónico (CPZ) (Goeger *et al.*, 1988; Seidler *et al.*, 1989). Los resultados obtenidos permiten concluir que, a corto plazo, la inhibición de la SERCA no tiene efecto en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (gráfica 4.4.6). Los niveles medidos de calcio citosólico no cambian tras la adición del CPZ a la placa en estudio. Se puede entonces concluir que son los sistemas de membrana plasmática los más influyentes en el mantenimiento de la homeostasis de la concentración de calcio citosólico en estas neuronas, siendo en este modelo celular y en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo los L-VOCC y la PMCA los sistemas más relevantes en la entrada y salida de este ión, respectivamente.



**Gráfica 4.4.6** – El CPZ, un inhibidor de la SERCA, no altera a corto plazo los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las CGN. Registro cinético de la ratio 340/380 de las CGNs cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 50  $\mu\text{M}$  de CPZ con inicio de registro a los 660 segundos.

#### 4.4.5. La disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ por bloqueo de los L-VOCC no se previene por los inhibidores del NCX o de la PMCA en las CGN en cultivo.

Una vez analizados los sistemas principales de entrada y salida de calcio de la membrana plasmática estudiamos las posibles sinergias derivadas de la presencia simultánea de varios bloqueantes, para determinar el orden jerárquico de estos sistemas en el mantenimiento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones normales de cultivo de las CGN. En la gráfica 4.4.7 se demuestra que la eosina Y y el KB-R7943 son adicionados junto con la nifedipina no tienen efecto adicional al observado sólo con la nifedipina en la concentración del calcio intracelular de las CGN en las condiciones normales de cultivo utilizadas en este trabajo. Así, la disminución en la  $[Ca^{2+}]_i$  es igualmente rápida y no es significativamente distinta a la que se observa cuando se inhiben solamente los L-VOCC (gráfica 4.4.1– sección 4.4.1.). Este resultado nos permite concluir que los L-VOCC tienen un papel fundamental en el control de la homeostasis del calcio citosólico,  $[Ca^{2+}]_i$ , en estas neuronas en las condiciones normales de cultivo utilizadas en este trabajo.



**Gráfica 4.4.7** - La eosina Y y el KB-R7943 no atenúan ni revierten a corto plazo el efecto de la nifedipina en la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Registro cinético de la ratio 340/380 de CGNs cargadas con fura-2 AM en MLocke 25 durante 600 segundos y la posterior adición de 10 μM de nifedipina más 5 μM de eosina Y y 5 μM de KB-R7943 con inicio de registro a los 660 segundos.



#### 4.5. Importancia de la organización de los sistemas de transporte de calcio en microdominios asociados a los *rafts* lipídicos para el control de la homeostasis del calcio citosólico de las neuronas granulares del cerebelo maduras *in vitro*.

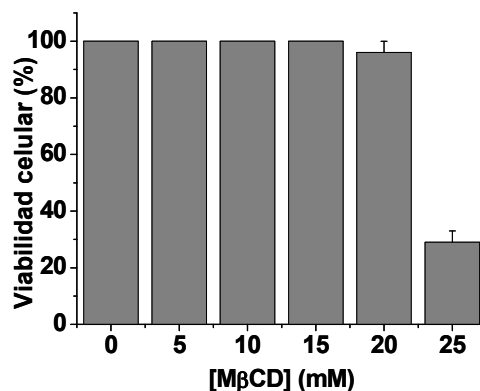
Colesterol y gangliósidos son marcadores característicos de los *rafts* lipídicos. El colesterol es un importante regulador en la organización de los lípidos en las membranas biológicas (Goldstein y Brown, 2001) que afecta las propiedades físicas de las membranas, tales como la compactación a nivel molecular de los fosfolípidos, la fluidez de membrana y potencia la fusión de membranas (Churchward *et al.*, 2005). Además está asociado a microdominios funcionales tipo *raft* lipídico funcionando como sitio de interacción específica proteína-lípido (Lucero y Robbins, 2004). Los gangliósidos están también implicados en interacciones lípido-proteína con funciones reguladoras o de focalización en microdominios estructurales. Teniendo en consideración que la neuraminidasa tiene la capacidad de liberar por hidrólisis romper el ácido N-acetil neuramínico, un constituyente de los gangliósidos del cerebro (Burton, 1963), se ha considerado la hipótesis de su aplicación en los estudios presentados en este capítulo. Sin embargo, los experimentos que hemos realizado con tratamientos de las CGN con neuraminidasa (digestión de las CGN con 0,4 U/ml de neuraminidasa durante 1h) no han revelado ninguna alteración significativa ni en el control de la homeostasis del calcio citosólico en respuesta a cambios de la concentración de potasio en el medio extracelular, ni a L-glutamato. Más aún, el tratamiento de las CGN con neuraminidasa no provocó cambios en los parámetros de FRET entre los pares de proteínas encontradas en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos siguientes: L-VOCC/NMDAr, nNOS/NMDAr, L-VOCC/caveolina-1 marcadas con sondas fluorescentes que forman un par donador/aceptor siguiendo los protocolos utilizados en secciones anteriores del capítulo de “Resultados” de esta Tesis Doctoral. Sin embargo, hemos encontrado que la metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD), conocida por romper la integridad de los dominios enriquecidos en colesterol de la membrana plasmática (Ko *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005; Shvartsman *et al.*, 2006), tiene efectos significativos sobre la homeostasis del calcio citosólico en las CGN y su respuesta a cambios de la concentración de potasio en el medio extracelular y a L-glutamato. Por estas razones, hemos cuestionado la posibilidad de que la M $\beta$ CD produzca alteraciones

de la organización estructural de los L-VOCC y de los NMDAr en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos descritos en los apartados anteriores en las CGN.

##### **4.5.1. Viabilidad celular de las neuronas granulares del cerebelo y medida del contenido en colesterol tras el tratamiento con la M $\beta$ CD.**

Con el objeto de iniciar un tratamiento en las CGN con la M $\beta$ CD se estudió primeramente el efecto de este compuesto en la viabilidad celular, para definir el intervalo de concentraciones de M $\beta$ CD en el que un tratamiento de duración controlada de las CGN no produce una pérdida significativa de la viabilidad celular. Para tal fin se han incubado las neuronas granulares de cerebelo a 37 °C con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD durante 10 minutos: 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mM. A continuación se ha analizado su viabilidad celular como ha sido descrito en la sección de “Materiales y métodos” (sección 3.5.2.). En la gráfica 4.5.1 se presentan los resultados obtenidos, utilizando como 100 % de viabilidad el resultado obtenido para la situación control, es decir, tratamiento en ausencia de la M $\beta$ CD. Se puede observar que la viabilidad celular se mantiene los 25 minutos del tratamiento con la M $\beta$ CD (tiempo de tratamiento más tiempo de reacción con el MTT) hasta una concentración de 20 mM de M $\beta$ CD en las placas. Por encima de esta concentración, el tratamiento con M $\beta$ CD induce una rápida pérdida de la viabilidad celular, ya que cuando subimos la concentración de M $\beta$ CD a 25 mM se observa una muerte de aproximadamente 70 % (gráfica 4.5.1).

Para confirmar que la M $\beta$ CD estaba extrayendo el colesterol de la membrana plasmática de las CGN se ha medido el contenido de colesterol en los lisados celulares y en el sobrenadante, después de realizar el tratamiento con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD preparada en tampón MLocke 25 durante 20 minutos. En la tabla 4.5 se puede observar la disminución de la concentración de colesterol en los lisados celulares en función de la concentración de M $\beta$ CD aplicada en la placa.



**Gráfica 4.5.1** – Viabilidad celular de las CGNs tras tratar con MβCD durante 10 minutos. Las concentraciones de MβCD utilizadas fueron 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mM. El porcentaje fue calculado en relación al control sin MβCD.

**Tabla 4.5** – Extracción del colesterol de las CGN por MβCD. Las medidas y determinación de la concentración de colesterol se han realizado como se ha descrito en el apartado 3.11 de “Materiales y métodos” en los lisados de CGN y en el sobrenadante de las CGN tras el tratamientos con diferentes concentraciones de MβCD.

[MβCD] (mM)	[Colesterol] (μM) en los lisados de las CGN	[Colesterol] (μM) en los sobrenadantes
0	12,3 ± 0,95	0,23 ± 0,07
5	7,3 ± 0,87	18,5 ± 1,3
10	2,2 ± 0,42	42 ± 3,2
20	2,7 ± 0,38	38,5 ± 5,7

#### 4.5.2. Efecto de la MβCD y de la neuraminidasa en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ de las CGN en un medio de bajo potasio extracelular (medio pro-apoptótico) y en un medio parcialmente despolarizante de la membrana plasmática (medio de supervivencia *in vitro*).

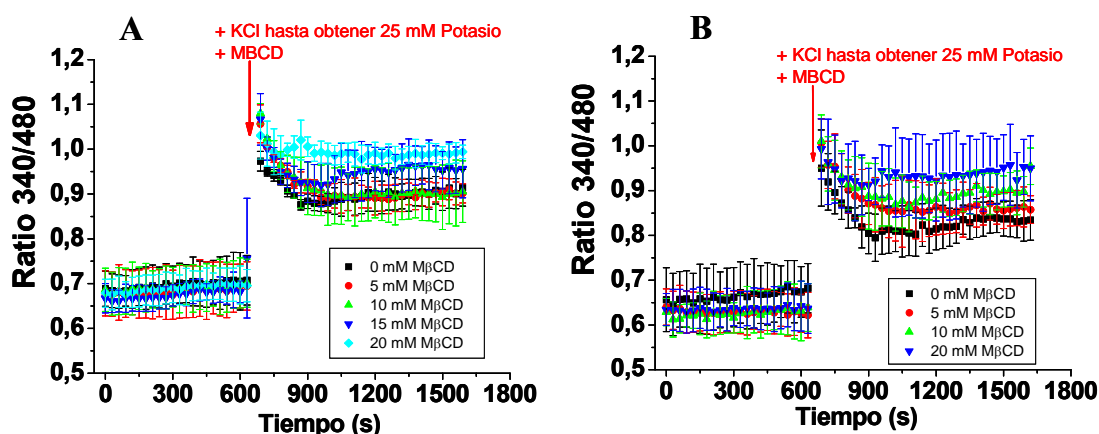
En la bibliografía ha sido ampliamente descrito que la disminución de la concentración de potasio ( $K^+$ ) del medio extracelular hasta 5 mM produce una disminución sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$  y que esta es una señal suficiente para inducir la apoptosis de las neuronas granulares de cerebelo cultivadas *in vitro* (Franklin y Johnson, 1992). La activación de los canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje (VOCC) permite racionalizar la subida de  $Ca^{2+}$  observada en las CGN después de una despolarización

parcial al incrementar la concentración de KCl hasta 25 mM (Franklin y Johnson, 1992; Marchetti y Usai, 1996; Evans y Pocock, 1999; Toescu, 1999). Las CGN maduras (7-8 DIV) expresan varios tipos de canales VOCC. Además de la expresión de los canales tipo L (L-VOCC) sensibles a las dihidropiridinas (DHP), estas neuronas expresan también los canales de tipo N, P, Q, R y T que son resistentes a los bloqueantes de los L-VOCC y tienen una velocidad de desactivación más rápida que la de los L-VOCC (Forti *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 1995; Randall y Tsien, 1995, 1997; Tottene *et al.*, 1996; Schramm *et al.*, 1999). Por otra parte, diversos estudios han demostrado que en CGN maduras, cultivadas en un medio donde la concentración de KCl es de 25 mM (K25), los canales de tipo L son los principales responsables de la subida sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras una despolarización parcial de la membrana por 25 mM de KCl en el medio extracelular promoviendo la supervivencia neuronal (Franklin y Johnson 1992; Marchetti y Usai, 1996; Sée *et al.*, 2001). La relevancia de esta subida sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$  producida por la despolarización parcial de la membrana en K25 es subrayada por el hecho de que en las primeras horas tras la inducción de apoptosis por 5 mM de KCl en el medio, la muerte celular puede ser ampliamente bloqueada simplemente por la adición de KCl al medio extracelular hasta alcanzar una concentración de 25 mM (Gallo *et al.*, 1987; Martin-Romero *et al.*, 2002b).

Teniendo en cuenta que los L-VOCC particionan extensamente en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de las CGN (como se ha concluido en secciones anteriores de este capítulo de “Resultados”) y lo indicado en el párrafo anterior, hemos cuestionado experimentalmente si M $\beta$ CD altera la respuesta de la  $[Ca^{2+}]_i$  cuando se eleva la concentración de KCl en el medio extracelular desde 5 a 25 mM. Para realizar estos experimentos hemos seleccionado dos tiempos de incubación de las CGN en medio con KCl 5 mM, 1 y 3h, porque resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que hasta las 3h el proceso apoptótico de las CGN se bloquea simplemente subiendo KCl en el medio extracelular hasta 25 mM (Martin-Romero *et al.*, 2002b), es decir, en la ventana temporal previa a la entrada de las CGN en la fase irreversible de la apoptosis. Después de medir la ratio 340/380, simultáneamente se añadieron 20 mM de KCl hasta completar los 25 mM y diferentes concentraciones de M $\beta$ CD, midiéndose a continuación la cinética de cambio de la ratio 340/380 durante aproximadamente 15 minutos. Los resultados obtenidos tras 1h de incubación de las CGN en K5 se presentan en la gráfica 4.5.2 – A y muestran que los cambios en los niveles de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la subida de KCl hasta 25 mM es idéntica al



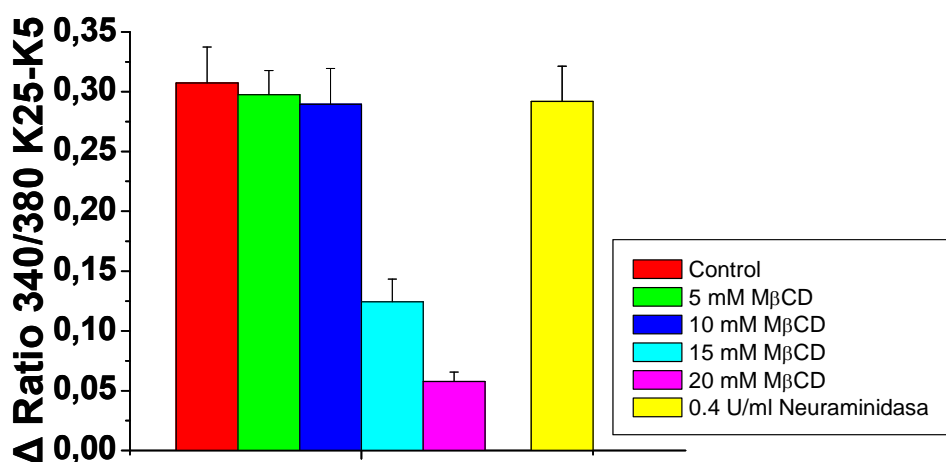
control a las concentraciones de 5 y 10 mM de M $\beta$ CD. Para concentraciones más elevadas de M $\beta$ CD, 15 y 20 mM, la cinética de caída de la  $[Ca^{2+}]_i$  después de la rápida subida inducida por la despolarización de la membrana plasmática se ve atenuada, lo que tiene como consecuencia que la  $[Ca^{2+}]_i$  se mantenga más elevada de manera más sostenida. Una incubación de 3h de las CGN en K5 las sensibiliza a la M $\beta$ CD, ya que en este caso la ralentización de la cinética de caída de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la rápida subida inducida por la despolarización de la membrana plasmática se observó a la concentración más baja estudiada de M $\beta$ CD, 5 mM (gráfica 4.5.2 – B).



**Gráfica 4.5.2** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular inducidos por cambios en la concentración de potasio en el medio extracelular de 5 mM a 25 mM, en CGNs tratadas con diferentes concentraciones de M $\beta$ CD. A – tratamiento con bajo potasio (K5) durante 1 hora. B – tratamiento con bajo potasio (K5) durante 3 horas.

Los resultados anteriores sugieren cambios en el nivel de actividad de los L-VOCC inducidos por M $\beta$ CD en las condiciones de despolarización parcial de la membrana plasmática producida por 25 mM KCl en el medio extracelular. Para confirmar este punto hemos estudiado el efecto de la M $\beta$ CD sobre la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  cuando se cambia el medio de 25 mM KCl a 5 mM KCl en presencia de la M $\beta$ CD. En la gráfica 4.5.3 se presentan los resultados de ratio 340/380 obtenidos, que muestran la disminución de la respuesta celular para concentraciones iguales o superiores a 15 mM de la M $\beta$ CD, pero no a concentraciones de 5 y 10 mM de M $\beta$ CD. Por otra parte cuando se realiza el mismo experimento pero con una pre-incubación de 1 hora con 0,4 U/ml de neuraminidase no se observan alteraciones en la disminución de la concentración del calcio intracelular con respecto a la situación control (gráfica 4.5.3),

lo que permite excluir un papel relevante de los gangliósidos en la inactivación de los L-VOCC en las CGN por disminución de potasio en el medio extracelular.

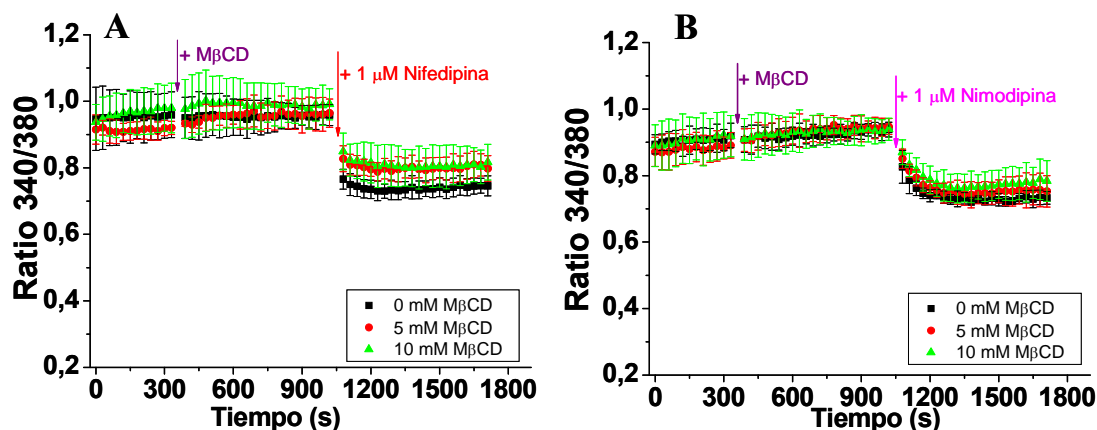


**Gráfica 4.5.3** – Disminución de la ratio 340/380 por alteraciones en la concentración de calcio intracelular inducidos por cambios en la concentración de potasio en el medio extracelular (25 mM – 5 mM), en CGN tratadas con diferentes concentraciones de MβCD y con neuraminidasa.

Considerando la importancia de los L-VOCC como principal vía de entrada de calcio en respuesta a cambios de la concentración de KCl en el medio extracelular (comentada previamente) se puede afirmar que no se observa un efecto significativo en la entrada de calcio mediada por estos canales para concentraciones inferiores o iguales a 10 mM MβCD. La concentración de 10 mM MβCD es, pues, desde un punto de vista metodológico un umbral significativo, teniendo en cuenta que esta es la concentración de MβCD para la cual se obtiene la mayor extracción de colesterol de las CGN (tabla 4.5). Por estas razones, la hemos utilizado en los experimentos siguientes como la concentración máxima de MβCD.

Para confirmar que la MβCD no altera la entrada de calcio por los L-VOCC se ha estudiado el efecto de los bloqueantes directos de los L-VOCC, la nifedipina y la nimodipina, sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  en presencia y ausencia de estas concentraciones de MβCD. Las dihidropiridinas (DHP) son agentes bloqueantes de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales L-VOCC, siendo la nifedipina y la nimodipina dos de las dihidropiridinas más ampliamente utilizadas (Fox *et al.*, 1987). Los resultados presentados en la gráfica 4.5.4 muestran que la respuesta a nifedipina y nimodipina no se ve significativamente alterada en presencia de concentraciones de 5 y 10 mM de MβCD. Por tanto, concluimos que con los tiempos de incubación de las CGN ensayados para estas

concentraciones de M $\beta$ CD la entrada de calcio a través de los L-VOCC no se altera significativamente.

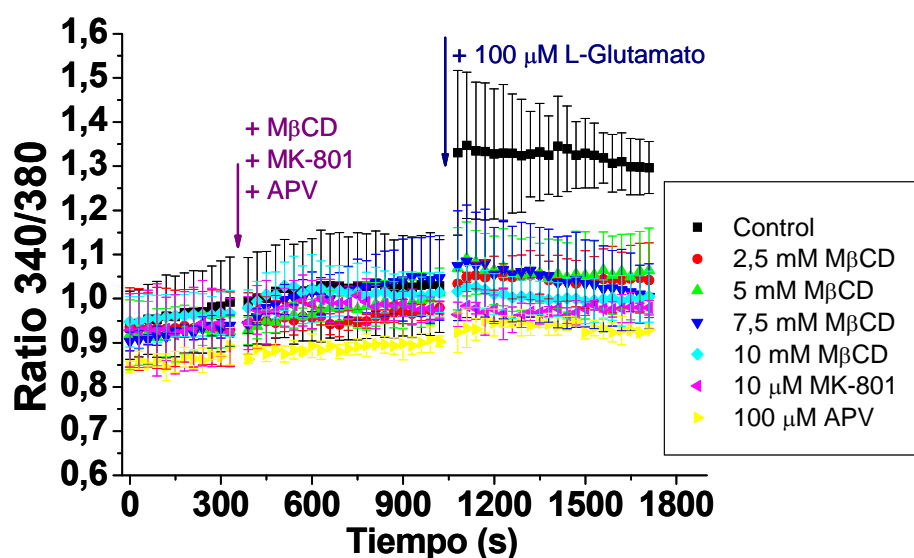


**Gráfica 4.5.4** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular inducidos por 1  $\mu$ M de nifedipina (A) o 1  $\mu$ M de nimodipina (B) en presencia de diferentes concentraciones de M $\beta$ CD añadida a los 300 s.

#### 4.5.3. Efecto de la M $\beta$ CD en la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en las CGN inducida por la adición de L-glutamato al medio extracelular: bloqueo de la entrada de calcio a través del NMDAr.

Los NMDAr desempeñan un papel muy relevante en la excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas como las CGN. Adicionalmente, en un estudio previo de nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la importancia del control de la entrada de calcio a través de los L-VOCC en la neurotoxicidad de L-glutamato tras exposición de las CGN al NaSH (García-Bereguiaín *et al.*, 2008) y en esta Tesis Doctoral hemos demostrado que los L-VOCC y los NMDAr se encuentran muy próximos dentro de los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos en las CGN. Por estas razones, hemos estudiado el efecto de la disrupción de los *rafts* lipídicos por tratamiento de las CGN con M $\beta$ CD sobre la respuesta del NMDAr a la adición extracelular de L-glutamato. Teniendo en consideración la tardía maduración de las subunidades de este receptor, descritas en Vallano *et al.* (1996), los experimentos se han realizado al DIV 10 de maduración *in vitro*. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica 4.5.5 y muestran la elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al L-glutamato en la situación control y en presencia de diferentes concentraciones de M $\beta$ CD y de dos antagonistas del NMDAr, [(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imino maleato] MK-801 y

[(2R)-amino-5-phosphonopentanoate] APV. Puesto que tanto MK-801 como APV bloquean completamente el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las CGN inducido por la aplicación de L-glutamato, podemos concluir que el efecto de L-glutamato se debe a la entrada de calcio a través del NMDAr. Estos resultados ponen de manifiesto: (1) que basta una concentración de 2,5 mM de M $\beta$ CD para eliminar el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de las neuronas granulares del cerebelo inducido por la adición de L-glutamato extracelular y (2) y que la depleción de colesterol celular por la M $\beta$ CD bloquea la activación del NMDAr inducida por L-glutamato.

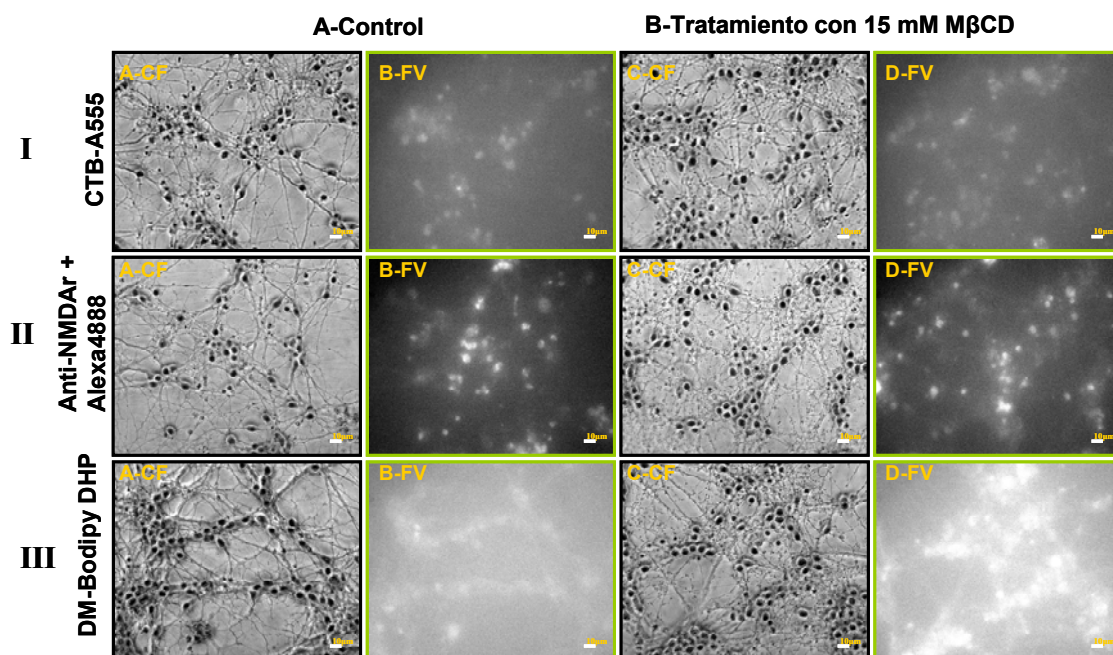


**Gráfica 4.5.5** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular cuando se añade 100  $\mu$ M de L-glutamato al medio extracelular de las CGN en la presencia de diferentes concentraciones de M $\beta$ CD y en presencia de los antagonistas del NMDAr, el MK-801 y el APV a los 300 s.

#### 4.5.4. Efecto de la M $\beta$ CD en la distribución de la CTB, de los L-VOCC y de los NMDAr en las neuronas granulares de cerebelo.

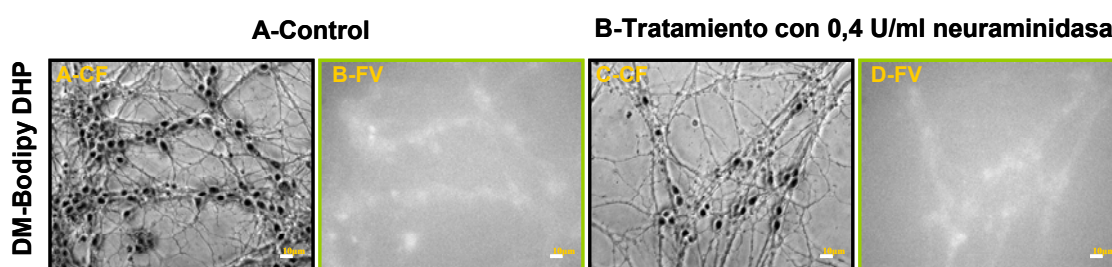
Teniendo en consideración la proximidad del L-VOCC y del NMDAr y la presencia de estos sistemas en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos hemos cuestionado experimentalmente si al eliminar colesterol de la membrana plasmática con M $\beta$ CD obteníamos un cambio significativo en la distribución de estos dos sistemas de entrada de calcio con respecto a la localización de la toxina B del cólera (CTB). Con este objetivo, hemos marcado separadamente las células con 1 $\mu$ g/ml CTB-A555, con

anti-NMDAr/IgG-Alexa488 y con 8 nM DM-Bodipy DHP, un ligando fluorescente de los L-VOCC. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de las CGN se adquirieron con el microscopio invertido Nikon Diaphot 300 equipado con un accesorio de epifluorescencia y una cámara ORCA- $R^2$  y posteriormente fueron analizadas con el *software* HCLImage de la cámara ORCA- $R^2$ . Las imágenes se adquirieron antes y después del tratamiento con 15 mM M $\beta$ CD. Los resultados obtenidos no permiten observar cambios tras el tratamiento con la M $\beta$ CD ni en la fluorescencia de CTB (figura 4.5.1- panel I), ni en la fluorescencia del complejo anti-NMDAr/IgG-A488 (figura 4.5.1 – panel II). Sin embargo, la fluorescencia del marcador fluorescente de los L-VOCC, DM-Bodipy DHP, cambia fuertemente tras el tratamiento con la M $\beta$ CD. En la figura 4.5.1 – panel III se puede observar un fuerte incremento en la intensidad de fluorescencia del DM-Bodipy DHP tras el tratamiento y además mucho más concentrada en los somas neuronales. Sin embargo la eficiencia de FRET entre el NMDAr y el ligando fluorescente del L-VOCC (ST-Bodipy DHP) no se vió significativamente alterada tras el tratamiento con 15 mM de M $\beta$ CD.



**Figura 4.5.1** – Efecto del tratamiento con 15 mM M $\beta$ CD durante 15 minutos en la fluorescencia de marcadores de la distribución de diferentes proteínas en las CGN. Imágenes representativas de contraste de fase (CF) y de la fluorescencia en verde (FV) de las células marcadas con 1  $\mu$ g/ml CTB-A555 (I), anti-NMDAr/Alexa488-IgG (II) y 8 nM DM-Bodipy DHP (III) antes (A) y después (B) del tratamiento con la M $\beta$ CD. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s.

Como se indicó anteriormente los gangliósidos son otros lípidos enriquecidos y característicos en los *rafts* lipídicos. Por esta razón, hemos cuestionado experimentalmente si el tratamiento con la neuraminidasa altera la distribución del L-VOCC en la membrana plasmática de las CGN. Sin embargo, el tratamiento de las CGN con 0,4 U/ml de neuraminidasa durante 1h no induce cambios observables de distribución de los L-VOCC, monitorizados utilizando la sonda DM-Bodipy DHP (Fig. 4.5.2).



**Figura 4.5.2** – Efecto del tratamiento de las CGN con 0,4 U/ml neuraminidasa durante 1 hora en la fluorescencia de DM-Bodipy DHP, un ligando fluorescente de los L-VOCC. Imágenes representativas de contraste de fase (CF) y de la fluorescencia en verde (FV) de las células marcadas con 8 nM DM-Bodipy DHP antes (A) y después (B) del tratamiento con la neuraminidasa. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s.

#### 4.6. Modulación de la homeostasis del calcio citosólico en las CGN por proteínas quinasas.

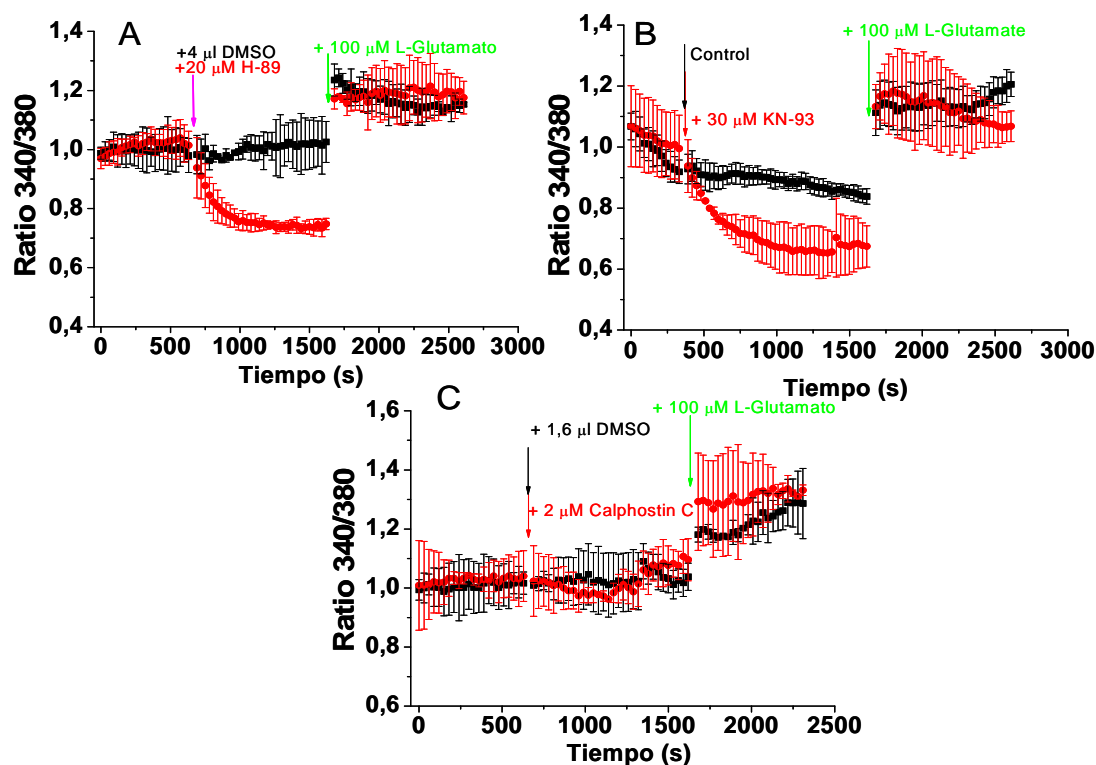
El efecto de la depleción de colesterol descrito en el apartado anterior apoya la hipótesis de un papel relevante del acoplamiento espacial entre las diferentes proteínas reguladoras y los sistemas de entrada de calcio de la membrana plasmática de las CGN en el control de la homeostasis del calcio citosólico. Adicionalmente, estos resultados sugieren estudiar los mecanismos moleculares por los que la depleción del colesterol puede modular la homeostasis del calcio citosólico en las CGN. A este respecto, ha sido reportado que la depleción de colesterol en cardiomiocitos puede modular la fosforilación de los L-VOCC y tener así un efecto indirecto en estos canales (Tsujikawa *et al.*, 2008), y en el mismo estudio se sugiere que la depleción de colesterol suprime la fosforilación de los L-VOCC catalizada por la PKA. El efecto de las proteínas quinasas en la entrada de calcio ha sido ampliamente estudiado en cardiomiocitos. En algunos de estos estudios se ha demostrado la regulación por la PKA de la PMCA (Baggaley *et al.*, 2007), de los L-VOCC (Gao *et al.*, 1997, Bünemann *et al.*, 1999; Kamp y Hell, 2000) y de los NMDAr (Raman *et al.*, 1996; Leonard y Hell, 1997; Tingley *et al.*, 1997). Otros estudios han mostrado que también la PKC está implicada en la regulación de la actividad de la PMCA (Zylinska *et al.*, 1998), de los L-VOCC (Ren *et al.*, 2010) y de los NMDAr (Liao y Leonard, 1999) y la interacción de los L-VOCC y de los NMDAr con la proteína quinasa II dependiente de la  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) ha sido ampliamente documentada (Gallo *et al.*, 1987, Gardoni *et al.*, 2001, Grueter *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2012), así como la modulación funcional de la PMCA por la CaMKII (Colyer, 1998; Valverde *et al.*, 2005). Por otra parte, Razani *et al.* (1999) han demostrado la co-localización y la interacción directa entre el dominio “*scaffolding*” de la caveolina-1 y la subunidad catalítica de la PKA *in vitro* e *in vivo*, y Pinard *et al.* (2005) han reportado la co-localización de los L-VOCC (CaV1.2) y de la CaMKII. Más aún Suzuki *et al.* (2008) han sugerido la asociación de la CaMKII con los *rafts* lipídicos.

Por estas razones, hemos estudiado el efecto de inhibidores ampliamente aceptados de estas proteínas quinasas en la homeostasis del calcio citosólico en las CGN maduras *in vitro* en el medio químicamente definido utilizado en las medidas del calcio intracelular realizadas en los apartados anteriores de los “Resultados” de esta Tesis Doctoral.

**4.6.1. Efecto de los inhibidores de la PKA, CaMKII y PKC en las alteraciones de la homeostasis del calcio intracelular de las CGN inducidas por L-glutamato y por la nifedipina.**

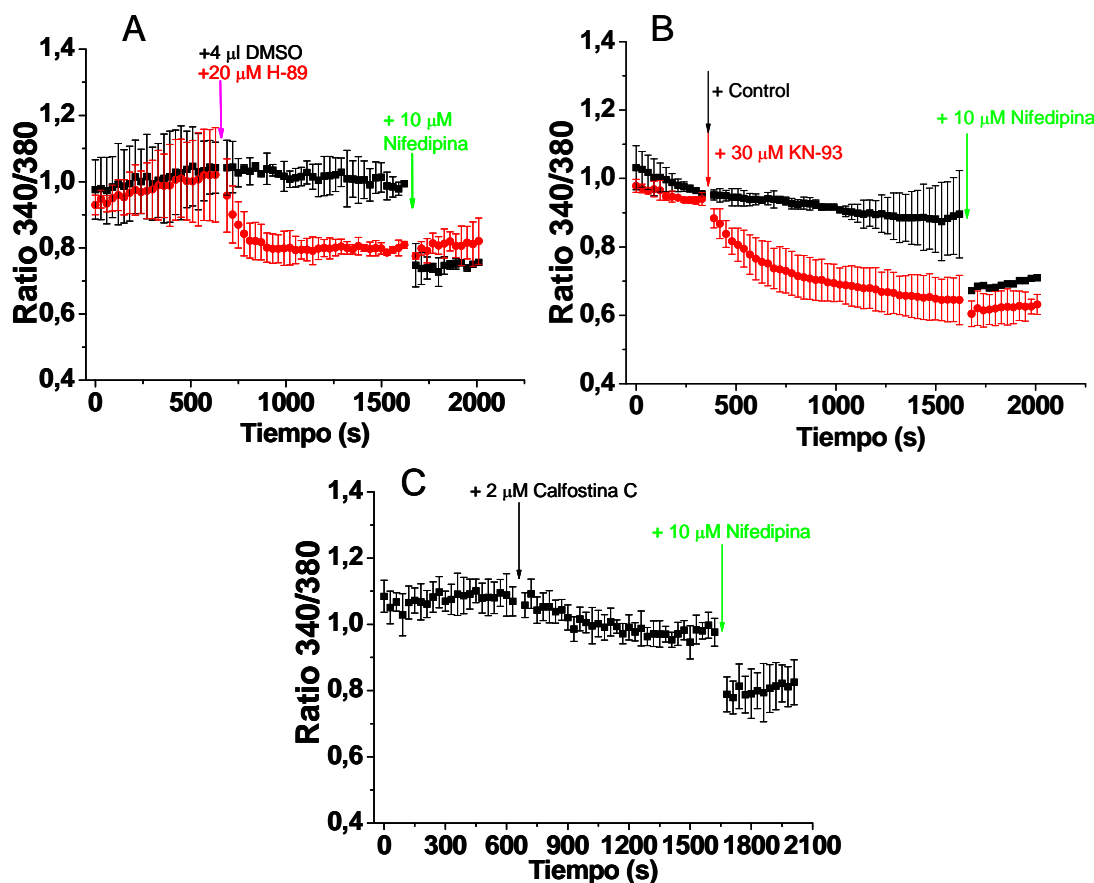
Para evaluar el posible efecto de PKA, PKC y CaMKII hemos utilizado los inhibidores específicos de estas proteínas quinasas H-89, callostina C y KN-93, respectivamente. En la gráfica 4.6.1 se presenta el efecto de estos inhibidores en condiciones sin tratamiento donde las células están en tampón MLocke 25 y tras algunos minutos de estabilización se les añade el inhibidor. Después de comprobar que la señal es estable (aproximadamente 15 minutos) se ha añadido 100  $\mu$ M L-glutamato y se han adquirido datos durante unos 10-15 minutos. Podemos observar que la adición al medio de cultivo de los inhibidores de la PKA (H-89) y de la CaMKII (KN-93) produce una disminución de la ratio 340/380 en un corto espacio de tiempo (gráfica 4.6.1 - A y - B). Por el contrario, la adición del inhibidor de la PKC (callostina C) no produce disminución de la ratio 340/380 (gráfica 4.6.1 - C). Sin embargo, el valor de la ratio 340/380 alcanzado tras la adición de L-glutamato no se ve alterado significativamente en presencia o ausencia de los inhibidores de estas proteínas quinasas (gráfica 4.6.1 – A-B).





**Gráfica 4.6.1** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular en las CGN mediada por la adición de 20  $\mu\text{M}$  H-89 (A), 30  $\mu\text{M}$  KN-93 (B) y 2  $\mu\text{M}$  calfoestina C (C) y posterior adición de 100  $\mu\text{M}$  de L-glutamato.

Una vez estabilizada la señal de ratio 340/380 tras la adición de los inhibidores de la PKA y de la CaMKII, la adición de la nifedipina a las placas no produce ningún cambio en la ratio 340/380 (gráfica 4.6.2 - A y - B), pero en el caso de utilizar la calfoestina C se observa una disminución de la ratio 340/380 idéntica a la observada en la situación control (gráfica 4.6.2 - C). En conjunto estos resultados muestran que los inhibidores de la PKA y de la CaMKII utilizados disminuyen la concentración del calcio citosólico hasta el nivel que se alcanza con los canales L-VOCC bloqueados, mientras que la calfoestina C no tiene efecto en la concentración de calcio intracelular en tampón MLocke 25.



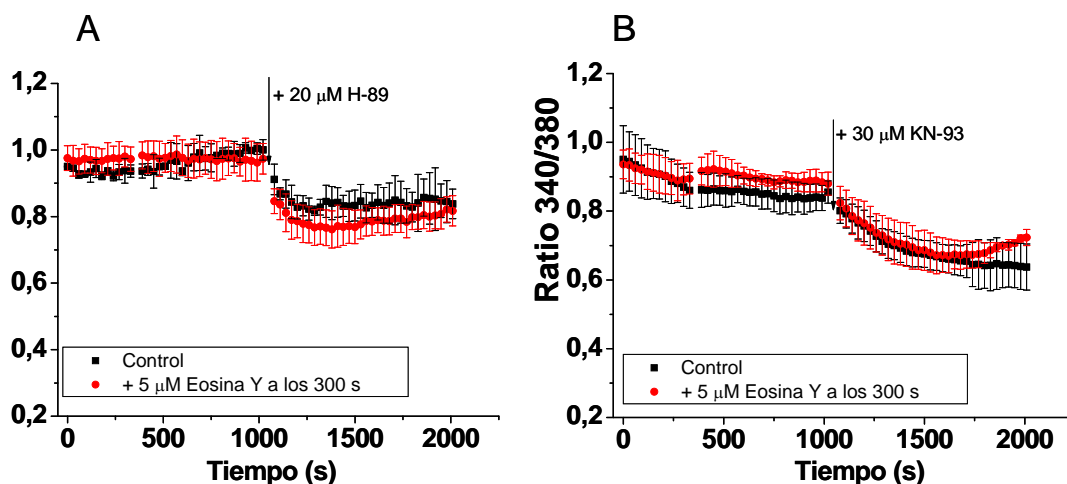
**Gráfica 4.6.2** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular en las CGN mediada por la adición de 20  $\mu\text{M}$  H-89 (A), 30  $\mu\text{M}$  KN-93 (B) y 2  $\mu\text{M}$  calfofostina C (C) y posterior adición de 10  $\mu\text{M}$  de nifedipina.

El efecto de la fosforilación de los L-VOCC por proteínas quinasas ha sido descrito en algunas situaciones como una consecuencia de la activación de la cascada de procesos de señalización dependientes del AMP cíclico (cAMP). Así, varios laboratorios han demostrado la regulación de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los L-VOCC por activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la subsiguiente activación de la vía del cAMP con posterior activación de la PKA (Bünemann *et al.*, 1999). Por otra parte, la fosforilación de estos canales en la treonina 498 (Thr498) de la subunidad  $\beta_{2a}$  por la CaMKII ha sido reportado que aumenta la intensidad de la corriente de entrada de calcio a través de los L-VOCC (Grueter *et al.*, 2006).

Por el contrario, nuestros resultados muestran que el inhibidor de la PKC, la calfofostina C, no tiene un efecto directo sobre la homeostasis del calcio citosólico en las CGN en medio MLocke 25. A este respecto debe reseñarse que la modulación de los L-VOCC por la PKC es un punto controvertido, ya que estudios con inhibidores de PKC

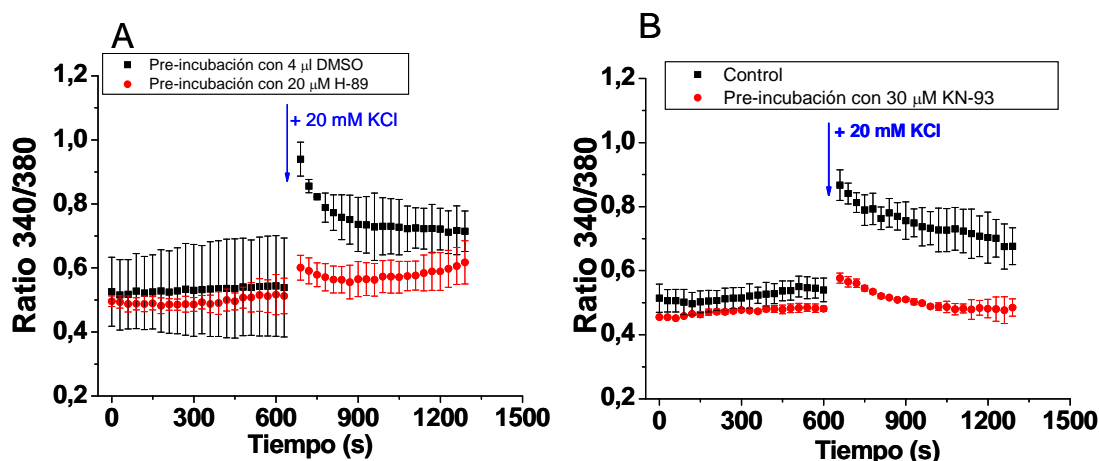
en cardiomiocitos y cerebro han demostrado diferentes efectos en la respuesta de estos canales (Kamp y Hell, 2000; McHugh *et al.*, 2000), siendo posible que diferentes isoformas de PKC tengan efectos opuestos en los L-VOCC.

Por otra parte, se ha descrito también que la PMCA se inhibe por estas proteínas quinasas (Zylinska *et al.*, 1998, Gromadzinska *et al.*, 2001, Baggaley *et al.*, 2007, Brini, 2009). Debemos recordar que en una sección anterior de esta Tesis Doctoral hemos presentado resultados experimentales que indican que la PMCA es el principal sistema de extrusión del calcio citosólico en el control de la homeostasis de este ión en las CGN. Por tanto, la activación de la PMCA subsiguiente a la inhibición de la PKA y de la CaMKII podría también explicar la disminución de la concentración del calcio citosólico inducida por los inhibidores H-89 y KN-93. Para cuestionar experimentalmente si la disminución del calcio citosólico observada con los inhibidores H-89 y KN-93 puede ser atribuible a una activación de la PMCA hemos estudiado si la eosina Y, un inhibidor de la PMCA (Slinchenko *et al.*, 1998; Slinchenko *et al.*, 2003), bloquea el efecto de H-89 y KN-93. En la gráfica 4.6.3 puede observarse que la preincubación de las CGN durante 10 minutos con eosina Y no bloquea la respuesta de la ratio 340/380 a los inhibidores de las proteínas quinasas PKA y CaMKII, si bien se observa una cierta atenuación de la disminución de la ratio 340/380 en el caso del inhibidor de la CaMKII, KN-93 (gráfica 4.6.3).



**Gráfica 4.6.3** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular en las CGN mediada por la adición de 20  $\mu\text{M}$  H-89 (A) y 30  $\mu\text{M}$  KN-93 (B) en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de eosina Y.

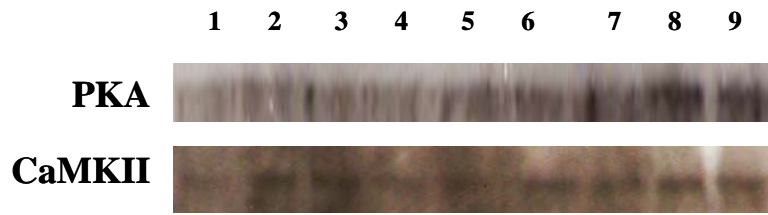
Como se ha indicado en una sección anterior de los “Resultados” de esta Tesis Doctoral, la elevación de la concentración de potasio en el medio extracelular desde 5 a 25 mM produce la despolarización parcial de la membrana plasmática de las CGN y la activación subsiguiente de los L-VOCC es la responsable de más del 75% de la rápida subida de la concentración del calcio citosólico que se registra durante los primeros 2-3 minutos tras la adición de KCl al medio extracelular (Gutierrez-Martin *et al.*, 2005). Por tanto, para confirmar que es la inactivación de los L-VOCC la principal causa de la disminución de la concentración del calcio citosólico (disminución de la ratio 340/380) producida por H-89 y KN-93 hemos estudiado el efecto de una preincubación breve con estos inhibidores sobre la cinética de la subida de la ratio 340/380 tras la adición del KCl necesario para aumentar la concentración de potasio hasta 25 mM en el medio extracelular. En el diseño de estos experimentos las CGN se han incubado un tiempo de 60 minutos en MLocke K5 antes de añadir KCl al medio extracelular, que es un tiempo suficiente para que las CGN se estabilicen tras la operación del cambio de medio efectuado pero muy corto para que puedan progresar significativamente en el proceso apoptótico que se induce en estas condiciones. En gráfica 4.6.4 se puede observar que la adición de 20 mM de KCl produce en las CGN control (tratadas con el vehículo DMSO sin inhibidor) una fuerte subida de los niveles de la ratio 340/380, con una posterior cinética de caída en la  $[Ca^{2+}]_i$ , mientras en la presencia de H-89 o de KN-93 esta subida se ve fuertemente atenuada y la cinética de caída posterior ( $t_{1/2} \leq 2$  minutos) restaura los valores de la situación anterior a la adición de KCl (gráfica 4.6.4). Por consiguiente, estos resultados refuerzan la hipótesis de que la modulación de los L-VOCC por PKA y CaMKII desempeña un papel crítico en la regulación de la homeostasis del calcio citosólico en las CGN, permitiendo que la concentración de calcio se mantenga dentro del intervalo de valores compatible con la supervivencia de estas neuronas en cultivo.



**Gráfica 4.6.4** - Cinética de las alteraciones en la concentración de calcio intracelular mediada por cambios en la concentración de potasio extracelular de 5 mM a 25 mM en CGN tratadas con 20  $\mu$ M H-89 (A) y con 30  $\mu$ M KN-93 (B).

#### 4.6.1. Determinación de la localización de la PKA y CaMKII en la membrana plasmática de las neuronas granulares del cerebelo.

Debido a la alteración de la actividad de los L-VOCC provocada por la presencia de inhibidores de la PKA y de la CaMKII hemos decidido identificar la localización de estas dos proteínas quinasas en la membrana plasmática de las CGN. Para tal fin se han utilizado los fragmentos de membrana preparados a partir de lisados celulares de CGN utilizando gradientes de densidad de sacarosa como se ha indicado en el apartado de “Materiales y métodos” (sección 3.7.1. y 3.7.2). Los análisis por *western blotting* de las fracciones revelaron que la PKA y la CaMKII están presentes en las fracciones 1-5 (Fig. 4.6.1) pero su distribución no es predominante en estas fracciones de membrana que contienen los marcadores de los *rafts* lipídicos. La PKA está más enriquecida en las fracciones lipídicas de membrana que no presentan características de *raft* (fracciones 6 a 9) mientras que la CaMKII tiene una distribución más ubicua asociada a todas las fracciones de membrana celulares (Fig. 4.6.1).



**Figura 4.6.1** – Determinación de la localización por *western blotting* de la PKA y CaMKII en las fracciones de membrana plasmática de CGN. La PKA (40 kDa) y la CaMKII (50 kDa) están presentes en todas las fracciones de membrana plasmática de las CGN. Los geles de electroforesis se cargaron con la misma cantidad de proteína por fracción.

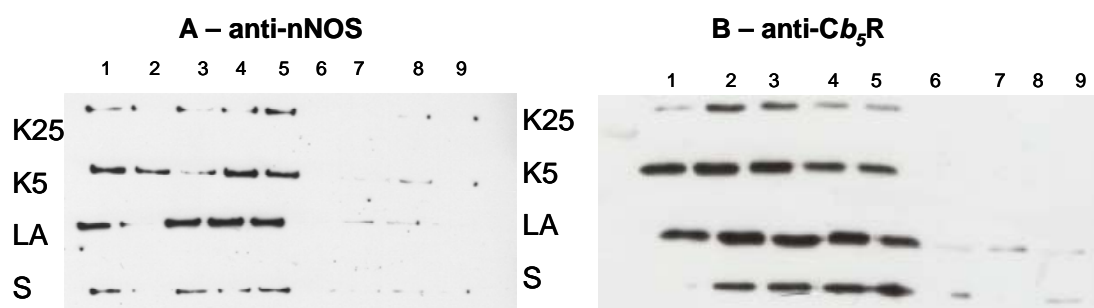
#### 4.7. Efectos de agentes moduladores de la función celular sobre la localización de los sistemas redox asociados a *rafts* lipídicos y sobre la homeostasis del calcio citosólico.

##### 4.7.1. La asociación de la nNOS y de la *Cb<sub>5</sub>R* a los *rafts* lipídicos no se debilita por estrés oxidativo focalizado en los mismos, ni por disrupción de los microfilamentos de actina.

Como hemos indicado previamente la producción de óxido nítrico y de anión superóxido en sitios vecinales en la estructura celular es particularmente relevante para la generación de peroxinitrito por reacción entre ambas ROS, debido al elevado coeficiente de difusión de las mismas y a su alta reactividad con múltiples dianas moleculares en el entorno celular. La estabilidad de la asociación de los sistemas redox nNOS y *Cb<sub>5</sub>R* a los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos es un punto relevante para la conceptualización de estos como microdominios focalizados de la membrana plasmática para la producción *in situ* de peroxinitrito. Por tanto, la posibilidad de retro-regulación por disociación de nNOS o *Cb<sub>5</sub>R* de los microdominios requería ser cuestionada experimentalmente. Adicionalmente, puesto que asociados a los *rafts* lipídicos se encuentran elementos del citoesqueleto celular, como microfilamentos de actina, hemos cuestionado experimentalmente si la integridad de los mismos es un requisito para la asociación de nNOS y *Cb<sub>5</sub>R* a estos microdominios.

La apoptosis de las CGN inducida por bajo potasio en el medio extracelular (5 mM KCl) nos ha servido como modelo celular para simular una situación de estrés oxidativo focalizado en los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos en las CGN, porque en las primeras horas tras la inducción de la apoptosis se produce una fuerte sobreproducción de anión superóxido por desregulación de la *Cb<sub>5</sub>R* asociada a estos microdominios (Samhan-Arias *et al.*, 2009; Samhan-Arias *et al.*, 2012). Por tanto, para alcanzar la máxima situación de estrés oxidativo por peroxinitrito y disrupción de los microfilamentos de actina hemos tratado a las CGN en medio con bajo potasio (K5), con latrunculina B (LA), que secuestra monómeros de actina a través de la formación del complejo 1:1 con la G-actina, causando una despolimerización acentuada en la red de actina (Coue *et al.*, 1987; Spector *et al.*, 1989; Wakatsuki *et al.*, 2001), y con el agente liberador de peroxinitrito, SIN-1 (S). En un estudio reciente de nuestro

laboratorio (Tiago *et al.*, 2011) hemos demostrado que el tratamiento con latrunculina B aplicado en este trabajo a las CGN es altamente eficiente para despolimerizar la actina en este cultivo de neuronas. Después de los tratamientos realizados en bajo potasio, en presencia de latrunculina B y SIN-1 con las concentraciones indicadas en la leyenda de la figura 4.7.1 se han purificado las fracciones de *rafts* lipídicos (para más detalles experimentales ver “Materiales y métodos”, apartados 3.6.1., 3.6.2. y 3.6.3.) y se han analizado por SDS-PAGE colocando en cada pocillo del gel la misma cantidad de proteína. Una vez desarrollada la electroforesis se han transferido las proteínas para visualizar las dos proteínas (nNOS y  $Cb_5R$ ) por *western blotting* como se indica en los “Materiales y métodos” y se han obtenido las imágenes de revelado presentadas en la figura 4.7.1.



**Figura 4.7.1** – Localización de la nNOS (A) y de la  $Cb_5R$  (B) en los *rafts* lipídicos en CGNs incubadas en un medio con potasio 25 mM (K25), potasio 5 mM (K5) y en células tratadas con latrunculina B (LA) y SIN-1 (S) durante 1h tal y como se describe en “Materiales y métodos”. La nNOS y la  $Cb_5R$  están fuertemente enriquecidas en los *rafts* lipídicos (fracciones 1-5) tras los diversos tratamientos. Cada calle de la electroforesis fue cargada con la respectiva fracción y con la misma cantidad de proteína.

Los resultados obtenidos demostraron que en las CGN la nNOS y la  $Cb_5R$  se mantienen firmemente asociadas a los *rafts* lipídicos en las primeras fases de apoptosis inducida por bajo potasio en el medio extracelular (MLocke 5), incluso en situaciones de disrupción del citoesqueleto de actina por latrunculina B (LA) y en condiciones de fuerte estrés oxidativo generado por exposición a peroxinitrito extracelular (SIN-1, S). De hecho, los resultados muestran un incremento de 2 veces del nivel de nNOS y 2,5 veces del nivel de  $Cb_5R$  presente en los *rafts* lipídicos preparados de CGN después de 3h desde el inicio de la apoptosis en K5 con respecto a los preparados a partir de CGN en condiciones control no apoptóticas - K25 (Fig. 4.7.1). De manera similar, el tratamiento con LA produce un incremento de la nNOS y  $Cb_5R$  presente en los *rafts*

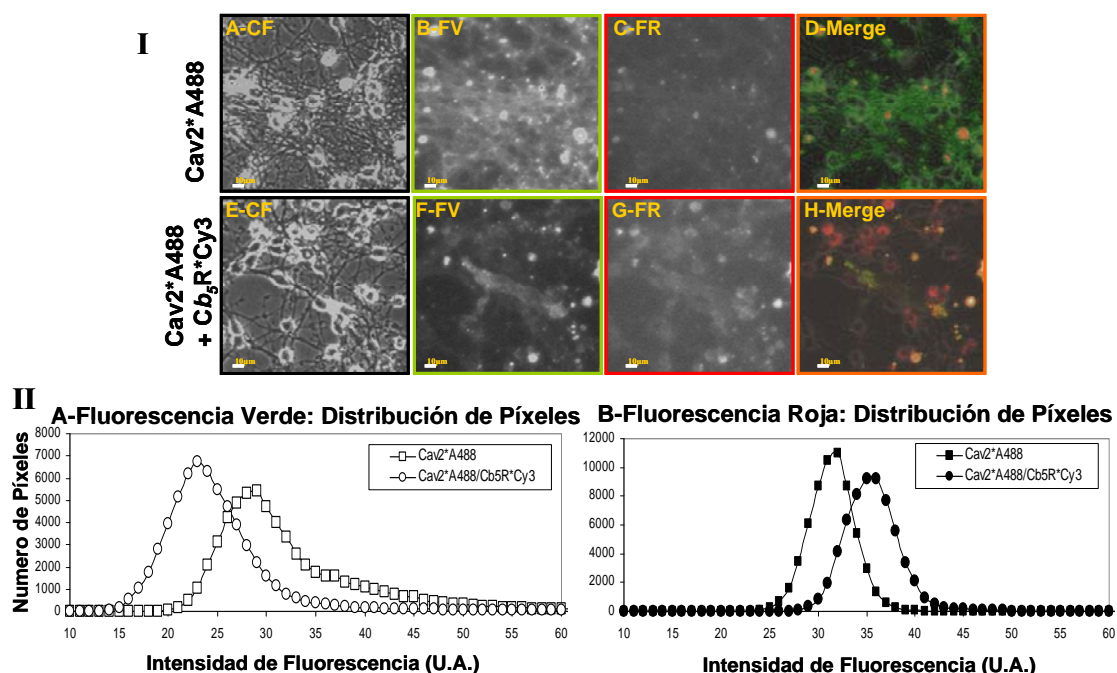


lipídicos de 2,4 veces y de 2 veces, respectivamente, en situaciones de disrupción del citoesqueleto de actina con respecto a los preparados a partir de CGN en condiciones control no apoptóticas (Fig. 4.7.1). Sin embargo, en las situaciones de estrés oxidativo el cambio de cantidad de proteína en los *rafts* lipídicos no es relevante ( $< 1,1$  veces) y en el caso de la  $Cb_5R$  estadísticamente poco significativo ( $p > 0,05$ ) con respecto a las CGN en condiciones control no apoptóticas (Figura 4.7.1). Por tanto, en conjunto estos resultados sugieren que hay un incremento de focalización de estas proteínas en los *rafts* lipídicos en las primeras fases del proceso apoptótico y tras la disrupción de los microfilamentos de actina. Además, los resultados demuestran que estas proteínas se mantienen firmemente unidas a los *rafts* lipídicos de las CGN en condiciones de estrés oxidativo mediado por peroxinitrito.

#### **4.7.2. La $Cb_5R$ está presente en los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos detectados por FRET en las etapas tempranas de la apoptosis de las CGN inducida por bajo potasio en el medio extracelular.**

Como se ha demostrado en trabajos previos la  $Cb_5R$  y las caveolinas co-localizan dentro de sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos, a una distancia inferior al límite de distancias que permiten una eficiencia de FRET detectable experimentalmente utilizando anticuerpos marcados con fluoróforos que forman un par donador y aceptor [(Samhan-Arias *et al.*, 2009) y en la sección 4.1.1. de los “Resultados” descritos en esta Tesis Doctoral]. Hemos cuestionado experimentalmente si esta localización se mantenía en la fase temprana previa a la entrada en la fase irreversible de la apoptosis de las CGN inducida por un medio K5. Se han obtenido imágenes de microscopia de fluorescencia de CGN marcadas con doble tinción anti-caveolina-2/Alexa488-IgG y anti- $Cb_5R$ /Cy3-IgG. Las imágenes de fluorescencia verde y roja fueron obtenidas como se ha indicado previamente en los “Materiales y métodos”. En la figura 4.7.2 se observa una extensiva co-localización de los dos anticuerpos en la imagen de fusión (*merge*). Adicionalmente, en los histogramas de distribución de píxeles de los somas neuronales en función de su intensidad de fluorescencia se observa un desplazamiento de la intensidad de fluorescencia verde hacia valores de menor intensidad de fluorescencia en paralelo al desplazamiento hacia mayor intensidad de fluorescencia de los píxeles en las imágenes de fluorescencia roja. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de FRET entre los dos anticuerpos

marcados con los fluoróforos Alexa488-IgG y Cy3-IgG y a partir de los mismos se obtiene una disminución del valor promedio por píxel de la fluorescencia verde acompañado por un incremento del valor promedio por píxel de la fluorescencia roja en las células con doble tinción cuando se comparan con las células teñidas solamente con el fluoróforo donador anti-caveolina-2/Alexa488-IgG. Una elevada eficiencia de FRET es revelada por (i) una extinción media del  $60 \pm 10 \%$  de la fluorescencia del fluoróforo donador Alexa488 (emisión de fluorescencia verde) y (ii) un incremento de 2,6 veces de la relación entre las intensidades promedio por píxel de la fluorescencia roja y verde (ratio FR/FV), siendo  $0,36 \pm 0,11$  el valor de la ratio para las CGN teñidas sólo con anti-caveolina-2/Alexa488-IgG y  $0,93 \pm 0,18$  para las CGN con la doble tinción con anti-caveolina-2/Alexa488-IgG y anti-*Cb<sub>5</sub>R*/Cy3-IgG. Por tanto, este resultado conduce a la conclusión de que el Alexa488- y el Cy3-IgG ligados a la caveolina-2 y la *Cb<sub>5</sub>R*, respectivamente, están separados por una distancia media menor que 10 nm. Considerando el tamaño medio de los anticuerpos IgG primarios y secundarios usados, estos resultados demuestran que la *Cb<sub>5</sub>R* y la caveolina-2 están separados por menos de 100 nm.



**Figura 4.7.2** – Colocalización de la caveolina-2 con la *Cb<sub>5</sub>R* en condiciones apoptóticas (K5): Panel I - Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-caveolina-2 (dilución 1:25)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o con el anti-caveolina-2 (dilución 1:25)/Alexa488-IgG y anti-*Cb<sub>5</sub>R* (dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor). En

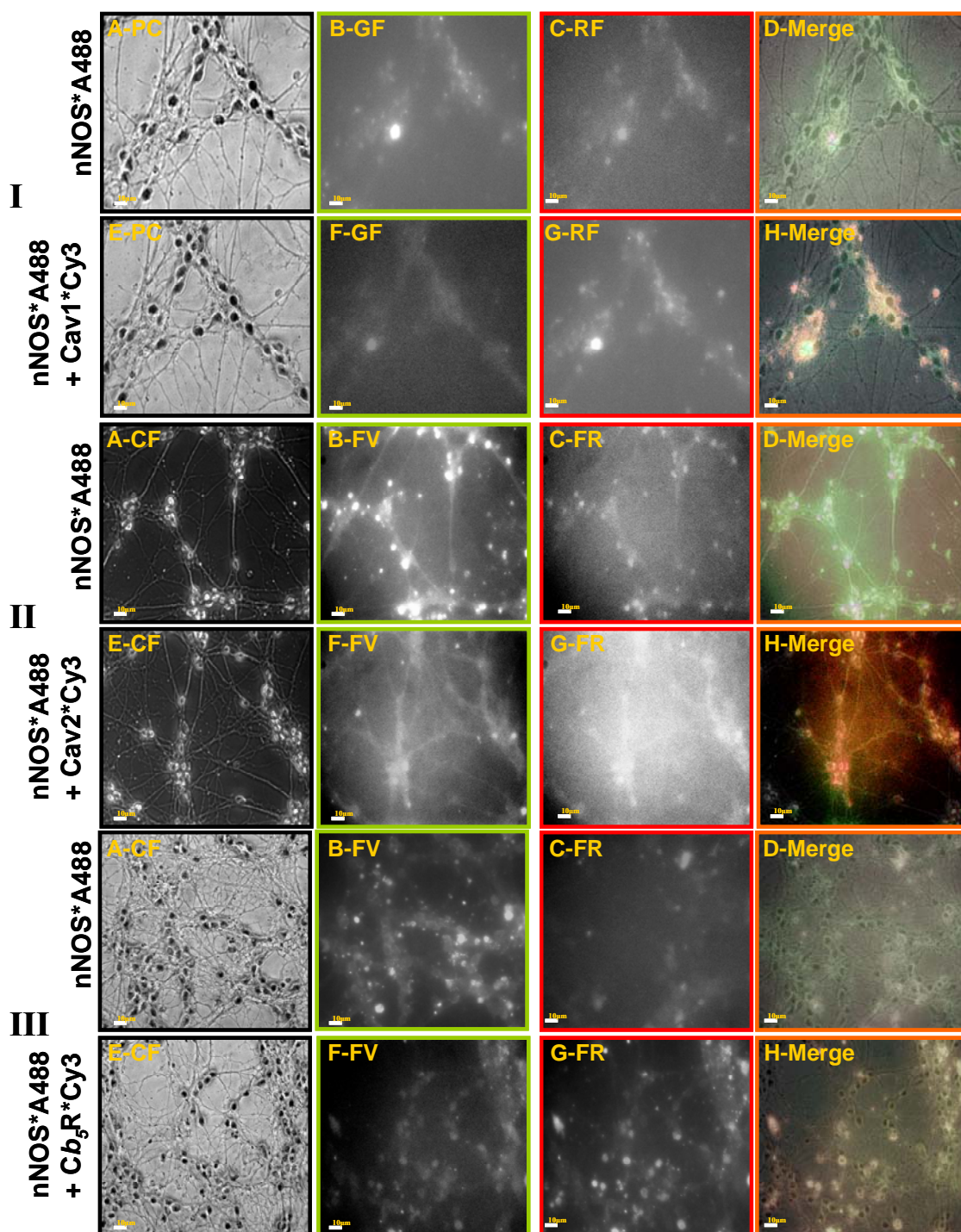
color naranja se indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 205,7 ms y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 243,1 ms. Panel II – Histogramas de distribución de la intensidad de fluorescencia por píxel, de las imágenes analizadas para el par caveolina-2 y *Cb<sub>5</sub>R*. La fluorescencia verde esta representada en A y la roja en B.

**4.7.3. La nNOS se mantiene unida a los submicrodominios asociados a los *rafts* lipídicos detectados por FRET cuando las CGN son expuestas al estrés oxidativo generado por el agente liberador de peroxinitrito SIN-1 y no sufre cambios significativos en su localización respecto a la *Cb<sub>5</sub>R*.**

Como se ha demostrado en el apartado 4.2 de los “Resultados” de esta Tesis Doctoral, la nNOS y las caveolinas co-localizan dentro de sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos, a una distancia inferior al límite de distancias que permiten una eficiencia de FRET detectable experimentalmente utilizando anticuerpos marcados con fluoróforos que forman un par donador y aceptor, como también ocurre con la nNOS y la *Cb<sub>5</sub>R*. En este apartado de los resultados hemos estudiado el efecto de la exposición de las CGN a flujos de peroxinitrito generados en el medio extracelular durante la descomposición de SIN-1. Tras el tratamiento de las CGN con 0,75 mM de SIN-1 durante 1 hora a 37 °C, se han fijado las células y posteriormente se han obtenido imágenes de microscopia de fluorescencia verde y roja de las CGN con doble tinción con anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG, así como con anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y con anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-*Cb<sub>5</sub>R* (DIA-1)/Cy3-IgG. En las imágenes de fusión (*merge*) de la figura 4.7.3 se observa una extensiva co-localización de los pares de anticuerpos marcados utilizados en cada caso y en los histogramas de distribución de píxeles de los somas neuronales en función de la intensidad de fluorescencia por píxel se observa el desplazamiento hacia menores valores de la intensidad de la fluorescencia del donador (fluorescencia verde) en paralelo al incremento de la intensidad de la fluorescencia por píxel en las imágenes de fluorescencia roja. Estos resultados demuestran la existencia de FRET entre los pares utilizados de los anticuerpos marcados con los fluoróforos fluorescentes Alexa488-IgG y Cy3-IgG. Los valores obtenidos a partir de los histogramas para la intensidad promedio por píxel confirman una disminución de la fluorescencia verde y un incremento de la fluorescencia roja en las células con doble tinción donador/aceptor

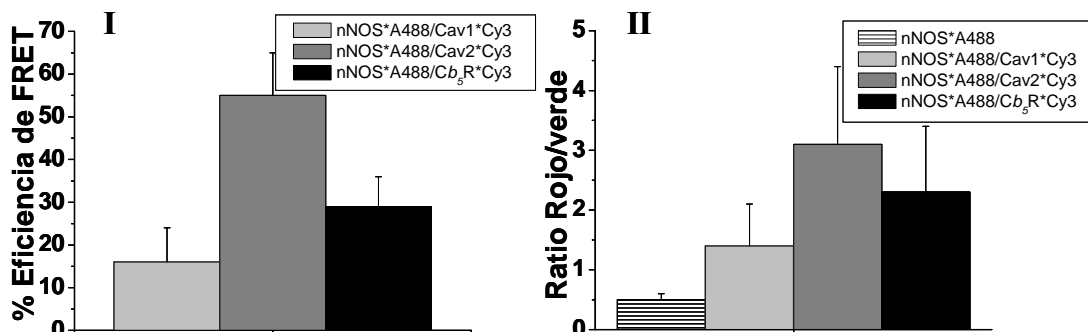
cuando se comparan con los valores obtenidos para las células teñidas solamente con el anti-nNOS/Alexa488-IgG. A partir de estos datos se han calculado los valores promedio de eficiencia de FRET entre los diferentes pares donador/aceptor utilizados, obteniéndose los siguientes resultados:  $16 \pm 8\%$  para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG, de  $55 \pm 10\%$  para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y de  $29 \pm 7\%$  para el par anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-*Cb<sub>5</sub>R*/Cy3-IgG (Figura 4.7.4 - panel I).

Adicionalmente, otro parámetro (el incremento de la ratio FR/FV) muestra claras evidencias de la existencia de una eficiencia de FRET significativa en estos casos: desde un valor de  $0,5 \pm 0,1$  para las CGN teñidas sólo con anti-nNOS/Alexa488-IgG hasta un valor de  $1,4 \pm 0,7$  para las CGN con doble tinción con el anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG,  $3,1 \pm 1,3$  para las CGN con doble tinción con anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-2/Cy3-IgG y  $2,3 \pm 1,1$  para las CGN con doble tinción con anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-*Cb<sub>5</sub>R*/Cy3-IgG (Figura 4.7.4 – panel II). Por tanto, estos resultados conducen a la conclusión de que el Alexa488-IgG ligado a la nNOS y el Cy3-IgG ligado a las caveolinas y a la *Cb<sub>5</sub>R* están separados por una distancia media menor que 80 nm. Considerando el tamaño medio de los anticuerpos IgG primarios y secundarios usados estos resultados demuestran que la nNOS y estas tres proteínas (caveolina-1, caveolina-2 y *Cb<sub>5</sub>R*) están separadas por menos de 80 nm.



**Figura 4.7.3** – Colocalización de la nNOS con la caveolina-1 (I), caveolina-2 (II) y *Cb<sub>5</sub>R* (III) tras el tratamiento de 0,75 mM SIN-1 durante 1 hora a 37 °C tal y como se describe en “Materiales y métodos”. Imágenes representativas en pseudo-color de las CGN marcadas con el anti-nNOS (dilución 1:50)/lexa488-IgG (dilución 1:100) (Imágenes A-D) o con el anti-nNOS (dilución 1:50)/Alexa488-IgG (dilución 1:100) y el anti-caveolina-1 y -2 (dilución 1:25)/Cy3-IgG (dilución 1:100) o anti-*Cb<sub>5</sub>R* (dilución 1:50)/Cy3-IgG (dilución 1:100) (Imágenes E-H). Las imágenes D y H representan la superposición de las imágenes de contraste de fases (CF), con la fluorescencia verde (FV-donador) y con la fluorescencia roja (FR-aceptor). En color naranja se

indican las áreas donde existe una elevada eficiencia de FRET. El tiempo de exposición utilizado para obtener las imágenes de fluorescencia verde fue de 0,5 s y para las imágenes de fluorescencia roja fue de 0,5 s.



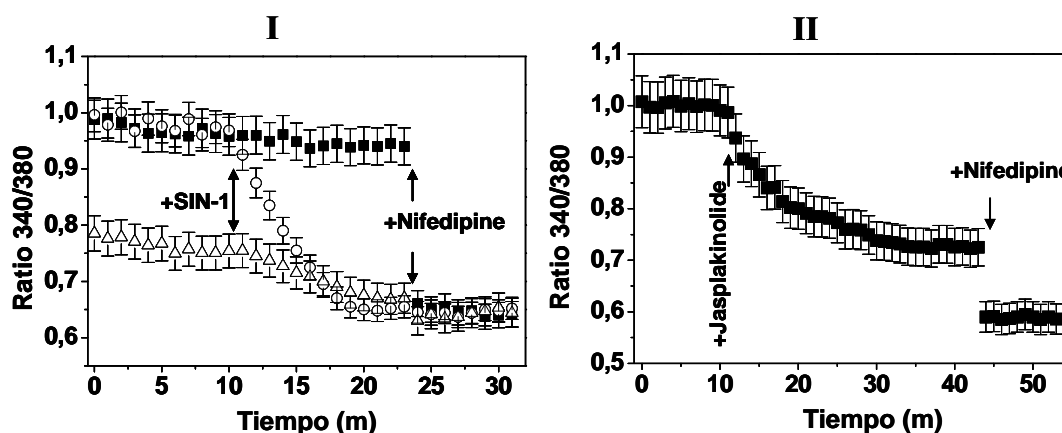
**Figura 4.7.4** – La nNOS esta a la distancia de FRET con la caveolina-1, caveolina-2 y Cb<sub>5</sub>R tras el tratamiento con 0,75 mM SIN-1. Análisis cuantitativa de las imágenes de fluorescencia. Panel I - Eficiencia de FRET entre la nNOS y la caveolina-1, -2 y Cb<sub>5</sub>R. Panel II - Ratio rojo/verde en presencia del donador (anti-nNOS/Alexa488-IgG) y del donador con el aceptor (anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti- caveolina-1 ó -2 o Cb<sub>5</sub>R/Cy3-IgG).

Estos resultados son idénticos a los obtenidos en las situaciones control (sin tratamiento con SIN-1) (secciones 4.2.1. y 4.2.2. de “Resultados”) lo que demuestra que la exposición a un estrés oxidativo mediado por peroxinitrito no promueve la separación de estas proteínas de los microdominios asociados a los *rafts* lipídicos, ni incluso una significativa alteración de la posición espacial relativa de estas proteínas en los mismos.

#### 4.7.4. Efecto del SIN-1 y del jasplakinolide en la entrada de calcio a través de los L-VOCC

El SIN-1, aunque no tenga efecto en la distribución de la nNOS y de la Cb<sub>5</sub>R en los *rafts* lipídicos (véase el apartado anterior), modula la actividad de los L-VOCC como ha sido descrito en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Gutierrez-Martin *et al.*, 2005). Puesto que en un trabajo más reciente de nuestro laboratorio (Tiago *et al.*, 2011) se ha demostrado que SIN-1 induce despolimerización parcial de los microfilamentos de actina, en esta Tesis Doctoral hemos confirmado esta modulación de los canales L-VOCC en una situación control y en presencia de jasplakinolide, una droga que produce la estabilización de los microfilamentos de actina. Si bien se ha

confirmado la disminución del calcio citosólico inducida por una exposición a SIN-1 de corta duración, la preincubación de las CGN durante 30 minutos con 2  $\mu$ M de jasplakinolide atenuó ampliamente el valor inicial de la concentración de calcio citosólico y la caída de calcio citosólico inducido por el SIN-1 se redujo cerca del 50 % (Fig. 4.7.5 – panel I). De hecho, nuestros resultados mostraron que el tratamiento con el jasplakinolide produce una disminución del calcio citosólico (un hecho experimental novedoso) que puede ser racionalizada en términos de la inhibición de la entrada de calcio a través de los L-VOCC (Fig. 4.7.5 – panel II). Adicionalmente, estos resultados sugieren que alteraciones inducidas en el citoesqueleto de actina pueden correlacionarse con las alteraciones inducidas por el SIN-1 en la concentración del calcio citosólico en las CGN.



**Figura 4.7.5** – Efecto de SIN-1 y jasplakinolide sobre la concentración de calcio citosólico. Panel I – La pre-incubación de las CGN con 2  $\mu$ M de jasplakinolide atenuó la respuesta inducida por SIN-1 sobre la concentración de calcio intracelular. La flecha doble indica la adición de SIN-1 al medio en CGNs incubadas en ausencia (círculos) y en presencia (triángulos) de jasplakinolide. El registro de las CGNs sin preincubar con jasplakinolide, ni SIN-1, tras adicionar nifedipina está representado por los cuadrados. Panel II – Respuesta sobre la concentración de calcio citosólico de las CGNs, tras adicionar 5  $\mu$ M de jasplakinolide en el medio de cultivo.





## ***5. Discusión***



Todos los datos presentados en este trabajo experimental subrayan la presencia de amplias agrupaciones de los principales sistemas de entrada y salida de calcio de la membrana plasmática neuronal, en sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos con un tamaño medio  $\leq 100$  nm. Así, estos dominios enriquecidos en proteínas transportadoras de calcio son de hecho nanodominios. Estos resultados son consistentes con las conclusiones derivadas de estudios funcionales (Berridge, 1998; Berridge *et al.*, 2000) que han sugerido que los principales sistemas de transporte de calcio están compartimentalizados en microdominios proteicos (microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en proteínas). Considerando las dimensiones moleculares de los sistemas de transporte de calcio de la membrana plasmática aquí mencionados, o sea, NMDAr y L-VOCC (sistemas de entrada) y PMCA y NCX (sistemas de salida), su localización dentro de dominios de tamaño menor que 100 nm en un ambiente lipídico rígido (*rafts* lipídicos) sugiere fuertemente que estos nanodominios operan como una estructura de la membrana plasmática con características de microsensor de calcio desarrollado para un control ajustado de la excitabilidad neuronal por la señalización del calcio.

Los resultados analizados anteriormente indican la existencia de FRET entre anti-L-VOCC/Alexa488-IgG y anti-caveolina -1 o -2/Cy3-IgG, lo cual pone de manifiesto que estas proteínas se encuentran dentro de estos microdominios a distancia de FRET utilizando anticuerpos marcados. Estos resultados sugieren la posibilidad de anclaje de los L-VOCC a los microdominios de *rafts* lipídicos en las CGN en cultivo a través de su unión a complejos de caveolinas, una hipótesis que también se ve apoyada por los resultados de inmunoprecipitación, que demuestran que los L-VOCC co-precipitan con la caveolina-1. En el mismo sentido en los cardiomiocitos ya había sido descrito que los L-VOCC están asociados a microdominios de los *rafts* lipídicos en la membrana plasmática (O'Connell *et al.*, 2004) y otro estudio ha demostrado la presencia de la subunidad  $\alpha 2\delta 2$  de los L-VOCC en los microdominios ricos en colesterol de *rafts* lipídicos en cerebelo (Davies *et al.*, 2006). El trabajo experimental presentado en esta Tesis Doctoral subraya que los L-VOCC están asociados a los sub-microdominios de los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de las CGN en cultivo, apoyando la hipótesis de que ambos tipos de canal L-VOCC, el tipo miocito y el neuronal, particionan dentro de los microdominios de los *rafts* lipídicos en la membrana plasmática.

Considerando que la entrada de calcio por los L-VOCC y por los NMDAr tiene un papel de extrema importancia en el mantenimiento de la concentración de calcio citosólico necesaria para la excitabilidad y supervivencia de las neuronas granulares de cerebelo maduras (Balazs *et al.*, 1988; Franklin y Johnson, 1992; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005), la proximidad entre estas dos proteínas puede tener una elevada relevancia funcional para las neuronas. La presencia confirmada del NMDAr en estos microdominios a través de *western blotting*, inmunoprecipitación con la caveolina-1 y FRET con las dos caveolinas y con la toxina B del cólera es también consistente con otros resultados experimentales descritos en la bibliografía (Hering *et al.*, 2003; Besshoh *et al.*, 2007; Delinte-Ramirez *et al.*, 2008). Nuestros resultados describen la existencia de una localización del NMDAr y del L-VOCC en los sub-microdominios asociados a *rafts* lipídicos y enriquecidos en caveolinas de un tamaño promedio  $\leq 100$  nm, esta co-localización ha sido además confirmada con la utilización de la toxina B del cólera marcada con sondas fluorescentes. Teniendo en cuenta los tamaños moleculares del NMDAr y del L-VOCC, sus localizaciones dentro de dominios de tamaño menor que 100 nm en un ambiente lipídico rígido (*rafts* lipídicos) apoyan fuertemente la hipótesis de que estos nanodominios deben ser conceptualizados como microsensores de calcio de la membrana plasmática para un riguroso control de la excitabilidad neuronal por señalización dependiente de calcio. Así, en línea con esta hipótesis se destaca en esta Tesis Doctoral que la distancia calculada para la separación del NMDAr y del L-VOCC dentro de estos nanodominios es  $\leq 40$  nm. Como fue anteriormente demostrado por Pareck (Parekh, 2008), a esta corta distancia la activación del L-VOCC puede elevar transitoriamente la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  local próximo al NMDAr hasta niveles de 10-100  $\mu\text{M}$ . Como esta concentración de calcio es lo suficientemente elevada como para estimular fuertemente la secreción del L-glutamato en la proximidad del NMDAr (García-Bereguian *et al.*, 2008), nuestros resultados sugieren que la activación del L-VOCC puede por sí mismo desencadenar la activación de su proteína vecina NMDAr en respuesta a bajas concentraciones extracelulares de L-glutamato. Así, esto confiere al L-VOCC un papel más relevante en la modulación de la excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas del normalmente asumido, tanto en la determinación del umbral de la excitabilidad neuronal, como en la modulación de la plasticidad sináptica y en la activación de las cascadas excitatorias inducidas por el L-glutamato. Debido al elevado coeficiente de difusión de los iones de calcio en el citoplasma, aproximadamente  $300 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  (Parekh, 2008), desde una perspectiva conceptual

puramente teórica la localización de los principales sistemas de extrusión del calcio en la membrana plasmática a menos de 100 nm de distancia desde los puntos de entrada de calcio no es necesaria para el control fino de las concentraciones de estado-estacionario del calcio citosólico. Por el contrario, esta localización próxima de los sistemas de entrada y salida de calcio es necesaria para generar gradientes de calcio locales, o microcompartimentos de ión calcio cerca de la membrana plasmática (Neher, 1998a). De hecho, la existencia de estos microcompartimentos ha sido destacada y demostrada en este trabajo por las imágenes microscópicas de ratio de fluorescencia de las CGN marcadas con fura-2 AM a tiempos cortos después de la adición de L-glutamato. Además, una observación cuidadosa de las imágenes de contraste de fase del campo brillante de las CGN después de la adición del L-glutamato reveló la co-localización de estos microcompartimentos de elevada concentración de calcio y anomalías de birrefringencia en la membrana plasmática de estas neuronas. Estas anomalías de birrefringencia están indicando que los microdominios de la membrana plasmática tienen lugar en sitios donde hay una distorsión significativa de la estructura tridimensional o de la forma de esta membrana, lo que es consistente con la ocurrencia de pequeñas protuberancias curvas en la escala de los sub-micrómetros. Las caveolinas, así como los principales elementos del citoesqueleto están presentes en estos sub-microdominios como ha sido demostrado por los resultados presentados en este trabajo y en trabajos previos (Samhan-Arias *et al.*, 2009), y estas proteínas son conocidas por tener una elevada plasticidad estructural (Head y Insel, 2007; Sonnino y Prinetti, 2009). Estos resultados, por tanto, refuerzan la hipótesis de la asociación de estos sub-microdominios con la malla del citoesqueleto de caveolinas y también con la generación transitoria de microcompartimentos con elevadas concentraciones de calcio cerca de la membrana plasmática.

La localización de la PMCA y del NCX cerca de los límites de estos sub-microdominios no es sólo consistente con los resultados de proximidad obtenidos del análisis de los datos de FRET, sino que también es consistente con la necesidad lógica de mantener el gradiente de calcio local restringido en un elemento de volumen pequeño del citoplasma. De hecho, esto es lo equivalente a introducir una elevada capacidad estática para tamponar calcio cerca de la periferia del elemento de volumen del microcompartimento en las ecuaciones desarrolladas por Neher (Neher, 1998b), un elemento que define el perfil espacial de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . El conjunto de resultados presentados en el apartado 4.1.5 confirman la asociación de la PMCA con los sub-

microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de las CGN maduras en cultivo, lo que es consistente con resultados obtenidos por otros laboratorios utilizando otros modelos experimentales (Sepulveda *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). Por otra parte, la menor intensidad de FRET desde el donador anti-PMCA1/4/IgG-Alexa488 hacia anti-caveolina-1/IgG-Cy3 indica una mayor distancia de separación promedio entre PMCA y caveolina-1 con respecto a la que se deriva de los resultados de FRET obtenidos con los pares anti-PMCA1/4/caveolina-2 y anti-PMCA1/4/flotillina. Adicionalmente, estos resultados resaltan la partición de esta proteína en la malla del citoesqueleto asociado a las regiones de los microdominios más enriquecidas en la flotillina y en la caveolina-2 que en la caveolina-1, un resultado consistente con el hecho experimental de que esta proteína se observa no sólo en las fracciones de *rafts* lipídicos sino también en las demás fracciones de membrana aisladas de las CGN (resultado en el apartado 4.1.1), presentando una distribución menos pronunciada en los *rafts* lipídicos. Adicionalmente, la inmunoprecipitación con caveolina-1 apoya de igual modo esta interpretación (resultado en el apartado 4.3.3). En el caso del NCX se observó una clara distorsión de la distribución Gaussiana de los píxeles en la intensidad de fluorescencia roja para el caso del anti-NCX/anti-caveolina-2, marcados respectivamente con las sondas donador/aceptor IgG-Alexa488/IgG-Cy3 e indicando también la existencia de heterogeneidad en la distribución espacial para estos pares. Estos resultados tomados en conjunto con los resultados de distribución en la membrana e inmunoprecipitación de esta proteína con la caveolina-1 confirman que el NCX está asociado a los sub-microdominios de los *rafts* lipídicos en la membrana plasmática neuronal de las CGN maduras en cultivo pero no de una manera exclusiva, ya que hemos detectado también su presencia en otras fracciones de membrana. Además, los resultados indican una partición preferencial de esta proteína en la proximidad de la flotillina y de la caveolina-2 en la malla del citoesqueleto.

El análisis de la distribución de intensidad de píxeles en la fluorescencia verde y roja apunta que sólo en el caso de algunos pares donadores/aceptores utilizados en este trabajo hay indicaciones de heterogeneidad en la eficiencia de FRET, lo que significa que hay subpoblaciones de aceptores a distancias diferentes del donador. Más concretamente, la heterogeneidad en la eficiencia de FRET se observa en el caso del NMDAr marcado con el IgG fluorescente formando par donador/aceptor con la PMCA y el NCX marcados con el IgG fluorescente. Estos resultados pueden ser racionalizados en términos de que: (i) hay más de una PMCA o NCX por molécula de NMDAr

localizadas a diferentes distancias dentro de estos submicrodominios o (ii) que sólo una sub-población de la PMCA o del NCX de la membrana plasmática están localizadas dentro de estos sub-microdominios. La segunda posibilidad es más favorable para el NCX, debido a la heterogeneidad en la eficiencia de FRET también observada en el análisis de las imágenes de FRET utilizando la caveolina-2 marcada con el IgG como aceptor. Por otra parte, para la PMCA la hipótesis más favorable es la de que hay más de una molécula de PMCA por NMDAr, una interpretación que es también coherente con la heterogeneidad observada en la eficiencia de FRET cuando se utiliza el nNOS marcado con el IgG fluorescente como donador y la PMCA marcada con el IgG fluorescente como aceptor. Asimismo, los resultados presentados apuntan que la PMCA y el NCX deben estar separados por más de 50 nm de los L-VOCC, toda vez que no se observó una eficiencia de FRET estadísticamente significativa entre la PMCA y el NCX marcados con el IgG fluorescente y el ligando fluorescente del L-VOCC, la ST-bodipy dihidropiridina. Además, (1) el NCX está al menos a una distancia de 80 nm de la nNOS, del L-VOCC y de la PMCA y (2) la PMCA está al menos a 80 nm de distancia de la *Cb<sub>5</sub>R* y del NCX, ya que la eficiencia de FRET entre estas 2 proteínas marcadas con los anticuerpos que completan el par donador/aceptor no fue estadísticamente significativa. Por estas razones en el diagrama esquemático de la figura 5.1 – panel I (incluido al final de esta sección) hemos incorporado dos localizaciones diferentes para la PMCA en estos sub-microdominios.

En este trabajo debido a la alta sensibilidad de los L-VOCC para la modulación por ROS nos cuestionamos en primer lugar si los dos sistemas redox principales, la *Cb<sub>5</sub>R* y la nNOS, estarían cerca de estos canales tipo L en los microdominios de proteínas asociados a los *rafts* lipídicos. En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se demostró experimentalmente que la *Cb<sub>5</sub>R* es una proteína asociada a los microdominios de *rafts* lipídicos de la membrana plasmática de las CGN en cultivo (Samhan-Arias *et al.*, 2009). Posteriormente se confirmó por estudios de “docking” la hipótesis de una interacción electrostática directa de la *Cb<sub>5</sub>R* con las caveolinas y el posible impacto de las caveolinas al nivel de regulación de la *Cb<sub>5</sub>R* (Samhan-Arias *et al.*, 2012). Asimismo, a través del marcaje de proteínas con anticuerpos fluorescentes se ha confirmado que en estos microdominios los canales L-VOCC están dentro de la distancia de FRET con la *Cb<sub>5</sub>R*, la principal fuente de anión superóxido de la membrana plasmática neuronal. En conjunto estos datos sugieren una fuerte asociación de la *Cb<sub>5</sub>R* a los microdominios proteicos asociados a los *rafts* lipídicos como se ha demostrado además por la presencia

de esta proteína en las fracciones de *rafts* lipídicos aisladas de membrana plasmática de CGN (apartado 4.1.1). También en estas fracciones de *rafts* lipídicos se observa la presencia mayoritaria de la nNOS, y los experimentos de fluorescencia indican la existencia de FRET entre anti-nNOS/Alexa488-IgG y anti-caveolina-1/Cy3-IgG, lo cual pone de manifiesto que dentro de estos microdominios estas proteínas se encuentran a distancia de FRET utilizando anticuerpos marcados. La presencia de la nNOS en los submicrodominios de los *rafts* lipídicos es consistente con los resultados de estudios de otros investigadores que apuntan que tanto la nNOS como el NMDAr unen dominios PDZ de las proteínas del citoesqueleto neuronal (Brenman y Bredt, 1997; Prybylowski *et al.*, 2005) y que la nNOS interacciona con la caveolina-1 (Sato *et al.*, 2004). Puesto que la producción de  $\cdot\text{NO}$  por parte de la nNOS depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre,  $\text{EC}_{50} \approx 0,2\text{-}0,4 \mu\text{M}$  (Bredt y Snyder, 1994), una localización vecina al nivel subcelular es la manera mas simple de obtener una rápida activación de esta enzima después de la activación del NMDAr y/o del L-VOCC. Adicionalmente, ha sido demostrada la inhibición del NMDAr por  $\cdot\text{NO}$  y su amplia relevancia para atenuar la excitotoxicidad de L-glutamato (Lei *et al.*, 1992). Por tanto, la proximidad de la localización entre la nNOS y el NMDAr permite también optimizar la inhibición por  $\cdot\text{NO}$  de la entrada excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  por vía del NMDAr, aportando una nueva perspectiva en el mecanismo de retroregulación para prevenir la sobreestimulación de la vía de señalización  $\text{Ca}^{2+}$ /L-glutamato/ $\cdot\text{NO}$ . Los resultados discutidos previamente en relación a la relevancia de los L-VOCC para un ajuste fino de la actividad de los NMDAr vecinales, vía estimulación de la secreción focalizada de L-glutamato, otorga una nueva dimensión a la proximidad observada entre la nNOS, la  $\text{Cb}_5\text{R}$  y los L-VOCC como analizamos a continuación.

La presencia de sistemas redox dentro de estos sub-microdominios capaces de generar ROS, como es el caso de la nNOS y la  $\text{Cb}_5\text{R}$ , es otro hecho novedoso y destacable en los resultados obtenidos. El análisis de proximidad basado en las eficiencias de FRET relativas entre diferentes pares donador/aceptor conduce a la conclusión de que (i) la nNOS está más cerca del NMDAr que de los L-VOCC y de la PMCA, y a una distancia mayor de 80 nm del NCX, o sea a una mayor que la distancia límite de FRET cuando se utiliza la doble tinción con anticuerpos, y (ii) la  $\text{Cb}_5\text{R}$  está más cerca del L-VOCC, y como la eficiencia de FRET no fue estadísticamente significativa para el par PMCA/ $\text{Cb}_5\text{R}$  se puede concluir que la PMCA esta distante de la  $\text{Cb}_5\text{R}$  dentro de estos sub-microdominios. Adicionalmente, los resultados demuestran



que, utilizando los anticuerpos primarios para la nNOS y para la  $Cb_5R$  marcados con las sondas IgG fluorescentes formando el par donador/aceptor, la nNOS y la  $Cb_5R$  están dentro del límite de la distancia FRET, es decir, separadas por menos de 80 nm. La producción del anión superóxido es un evento muy temprano en la apoptosis inducida por bajo potasio de los cultivos de CGN *in vitro*, un evento que tiene un papel crítico en el progreso de esta apoptosis neuronal a estadios posteriores que son irreversibles y que están asociados a la activación de caspasas (Valencia y Morán, 2001; Martin-Romero *et al.*, 2002b; Samhan-Arias *et al.*, 2012). En esta fase temprana de la apoptosis el anión superóxido es ampliamente generado en la membrana plasmática debido a la desregulación de la  $Cb_5R$  asociada a la membrana plasmática de las CGN (Samhan-Arias *et al.*, 2009). Más aun, otros estudios desarrollados en nuestro laboratorio han demostrado que en esta primera fase de apoptosis inducida por bajo potasio en el medio extracelular hay un incremento de la producción de anión superóxido focalizada en la membrana plasmática (Samhan-Arias *et al.*, 2012). Este exceso de producción de anión superóxido focalizado en la primera fase de la apoptosis inducida por bajo potasio se correlaciona con el incremento en la cantidad de la  $Cb_5R$  asociada a estas fracciones de membrana de microdominios de *rafts* lipídicos, en las que también se observa una presencia incrementada de la nNOS. Puesto que la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) se localiza asociada al citoesqueleto neuronal en las terminales sinápticas (Brenman y Bredt, 1997) y la reacción del  $\cdot NO$  con el anión superóxido es una reacción controlada por difusión con una constante bimolecular de  $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (Huie y Padmaja, 1993), la sobreestimulación de la producción de anión superóxido por la  $Cb_5R$  en la vecindad de la nNOS conlleva la rápida producción del peroxinitrito. Por tanto, la co-localización de la nNOS y de la  $Cb_5R$  dentro de estos sub-microdominios (demostrada en este trabajo) permite visualizar a estas estructuras como puntos focalizados de producción celular de este oxidante tan perjudicial y neurotóxico. De hecho, ha sido demostrado por numerosos estudios desarrollados a lo largo de la última década que el peroxinitrito es un fuerte oxidante producido en varios tipos de muerte celular en cultivos de neuronas *in vitro* (Ischiropoulos *et al.*, 1995; Trackey *et al.*, 2001; Gutierrez-Martin *et al.*, 2005) y también un agente principal en la neurodegeneración inducida por estrés oxidativo en isquemia/reperfusión en el cerebro (Iadecola, 1997), por inflamación (van der Veen *et al.*, 1997; Bao y Liu, 2002) y en enfermedades neurodegenerativas (Beal, 2000; van Damme *et al.*, 2005; Duenas *et al.*, 2006; Lagoa *et al.*, 2009; Gutierrez-Merino *et al.*, 2011).

Por estas razones, hemos desarrollado estudios complementarios para esclarecer el efecto de la exposición de las CGN a concentraciones y flujos controlados de peroxinitrito utilizando el compuesto SIN-1, un agente que se descompone espontáneamente liberando anión superóxido y  $\cdot\text{NO}$  (Kirsch y de Groot, 1999; Martín-Romero *et al.*, 2004b). El tratamiento de las CGN en cultivo con SIN-1 no demostró efecto alguno en la cantidad de  $\text{Cb}_5\text{R}$  y de nNOS presentes en estos microdominios cuando se comparó con la situación sin tratamiento (control). Tampoco hay diferencias en los valores de FRET observados entre estas dos proteínas y entre la nNOS y la caveolina-1 o -2 cuando se ha comparado con la intensidad de FRET observado en la situación control. Sin embargo, a los niveles de exposición a flujos de peroxinitrito generados por SIN-1 utilizados este compuesto altera la homeostasis de calcio vía los L-VOCC como se ha descrito previamente en Gutierrez-Martin (2005) y adicionalmente una pre-incubación con 5  $\mu\text{M}$  jasplakinolide, un agente estabilizador de los microfilamentos de actina, atenuó ampliamente el valor inicial de la concentración del calcio citosólico y la caída del calcio citosólico inducido por el SIN-1 se redujo cerca del 50 %. Los resultados obtenidos para la desregulación de la homeostasis del calcio citosólico por jasplakinolide son consistentes con los resultados obtenidos con latrunculina-B, que muestran que en las CGN tratadas con esta droga se observa un incremento en la cantidad de  $\text{Cb}_5\text{R}$  y de nNOS en las fracciones de *rafts* lipídicos. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis que la disrupción del citoesqueleto de actina puede llevar a una desregulación de la actividad de los sistemas de transporte de calcio presentes en estos sub-microdominios, pero no a la desestabilización y disrupción de estas sub-microestructuras. No obstante, los datos obtenidos hasta la fecha no permiten concluir que no se vean alteradas las interacciones proteína-proteína que estos sistemas tienen dentro de estos sub-microdominios. A este respecto, debe ser notado que ha sido ampliamente demostrado que los principales sistemas de transporte de calcio de la membrana plasmática estudiados en este trabajo (NMDAr, L-VOCC, PMCA y NCX) son dianas moleculares de las ROS generadas durante el progreso de estados neurodegenerativos del cerebro de mayor prevalencia en la sociedad humana (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amitrófica, isquemia/reperfusión e inflamación), revisado en (Gutierrez-Merino, 2008; Hidalgo y Donoso, 2008). Por otra parte, una alteración sostenida de la homeostasis del calcio citoplasmático ha sido también observada en las etapas más tempranas de la apoptosis neuronal (Franklin y

Johnson, 1992; Franklin y Johnson, 1994) y en las enfermedades neurodegenerativas (Choi, 1995; Mattson y Chan, 2001; Gutierrez-Merino, 2008; Hidalgo y Donoso, 2008).

En la figura 5.1 – panel I y II se presentan en forma de un diagrama esquemático las principales conclusiones sobre la organización espacial de las proteínas presentes en los sub-microdominios de *rafts* lipídicos derivadas de los resultados de FRET obtenidos en este trabajo (resumidos en las tablas 4.1, 4.2 y 4.3), incluyéndolos dentro de una protuberancia en base a las anomalías de birrefringencia observadas en estas regiones de la membrana plasmática, reseñadas previamente. En este diagrama se ha representado la información relativa a la distribución espacial de los principales sistemas de transporte de calcio y redox dentro de estos sub-microdominios, incluyendo los casos en los que no hemos encontrado una eficiencia de FRET estadísticamente significativa. A este respecto, debemos notar que en este trabajo debido al tamaño de las barras de error obtenidas en el análisis de resultados sólo se ha considerado demostrada la existencia de FRET cuando el porcentaje de eficiencia de FRET fue superior al 10%. Para estos casos, considerando el volumen y la geometría de los IgG (Saphire *et al.*, 2001), el valor de distancia para 50 % de eficiencia de FRET de los pares donador/aceptor utilizados (valores de  $R_0$ ) entre 5 y 6 nm (Haugland, 2005), y el hecho de que la eficiencia de FRET es menor del 10% para una distancia de separación de  $2 \cdot R_0$  en el caso de un único par donador/aceptor (Stryer, 1978; Gutierrez-Merino *et al.*, 1994) y también en el caso de una geometría centrada hexagonalmente y altamente empaquetada de múltiples aceptores por donador (Gutierrez-Merino, 1981b; Gutierrez-Merino *et al.*, 1994), se puede concluir que la ausencia de una eficiencia de FRET estadísticamente significativa implica una distancia de separación mayor que 80 nm cuando se utiliza la doble tinción con anticuerpos marcados con las sondas que forman pares donador/aceptor y mayor que 50 nm cuando sólo una de las proteínas de interés es teñida con el complejo anticuerpo primario+secundario fluorescente. El diagrama esquemático de la figura 5.1 – panel II representa un mapa a 3 dimensiones de baja resolución, donde la elevada eficiencia de FRET entre los pares donador/aceptor sugieren que, a pesar de que las interacciones lípido/proteína probablemente favorecen la incorporación de estas proteínas dentro de los *rafts* lipídicos, las interacciones proteína-proteína específicas deben desempeñar también un importante papel en la formación y estabilización de estos sub-microdominios asociados a los *rafts* lipídicos. Los resultados de inmunoprecipitación obtenidos tras solubilización de los *rafts* lipídicos con M $\beta$ CD son particularmente demostrativos de esta conclusión. Así lo demuestra la

inmunoprecipitación de los L-VOCC, del NMDAr, de la PMCA, del NCX y de la nNOS con la caveolina-1, además de la inmunoprecipitación del L-VOCC y de la nNOS con el NMDAr y de la nNOS con la *Cb<sub>3</sub>R*. En conjunto estos resultados ponen de manifiesto la existencia de numerosas interacciones estables (fuertes, ya que resisten a la deformación estructural que debe causar la extracción del colesterol) entre las proteínas presentes en estos sub-microdominios, probablemente formando complejos bien definidos y compactos dentro de los mismos. Estas interacciones pueden ser en algunos casos interacciones directas proteína-proteína, pero la presencia de una malla de caveolinas no nos permite excluir la posibilidad de que cuando la caveolina-1 se une a su anticuerpo en la inmunoprecipitación esta proteína co-precipite con las proteínas asociadas a al menos una parte de la malla del citoesqueleto de caveolinas donde esta incluida. Los resultados obtenidos, por tanto, permiten concluir que las interacciones proteína-proteína dentro de estos microdominios no se rompen tras la disrupción de los *rafts* lipídicos por parte de la M $\beta$ CD, un potente agente secuestrante de colesterol ampliamente utilizado para la solubilización de estos microdominios lipídicos.

La activación de una conductancia típica de 2,6 pS, como las de los L-VOCC, puede generar un microdominio de calcio con concentraciones de calcio superiores a 1  $\mu$ M que, en presencia de una baja capacidad de tamponar calcio, tiene una dimensión efectiva de aproximadamente 100 nm y esta distancia es una función de la capacidad tampón en el microentorno alrededor del L-VOCC (Parekh, 2008). Así, la dimensión alcanzada puede variar desde algunos nm hasta 82 nm en presencia de 0,1 mM del quelante de calcio fura-2. Puesto que la conductancia del NMDAr en las CGN es más de 11 veces superior a la conductancia del L-VOCC, o sea >30 pS (Cull-Candy y Usowicz, 1987), las ecuaciones derivadas por Neher (Neher, 1998b) permiten concluir que después de la activación del NMDAr este gradiente se va extender hasta más de 200 nm de distancia desde el poro de entrada del calcio del receptor en el caso de una capacidad muy baja para tamponar calcio en estos microdominios. Considerando que el tamaño máximo aceptado para los *rafts* lipídicos es de 200 nm (Pike, 2006), se puede concluir que los nano- y sub-microdominios de la membrana plasmática de estructura tridimensional ilustrada en el diagrama esquemático de la figura 5.1 – panel II pueden ser vistos como microcompartimentos focalizados de calcio.

A posteriori, el análisis de los sistemas más relevantes en la homeostasis del calcio citosólico en neuronas granulares de cerebelo reveló que los L-VOCC son los sistemas de entrada que desempeñan un papel crítico para el mantenimiento del nivel de

estado estacionario moderadamente elevado de la concentración del calcio citosólico al DIV 8. Esta conclusión se ha alcanzado a partir del análisis de los resultados obtenidos en las medidas del calcio citosólico en las CGN en presencia de la nifedipina o de la nimodipina, dos dihidropiridinas que son bloqueantes específicos de los L-VOCC. La referencia al día *in vitro* (DIV) es muy importante porque con el MK-801, el antagonista no competitivo del NMDAr, no se obtuvo ningún efecto significativo sobre la concentración del calcio citosólico, probablemente porque en el DIV 8 este receptor presenta una composición aún inmadura y funcionalmente inactiva de subunidades (Vallano *et al.*, 1996). De los dos sistemas de salida de calcio principales de la membrana plasmática, la PMCA y el NCX, nuestros resultados muestran que es el primero el que más importancia tiene en el mantenimiento de una concentración baja del calcio citosólico, ya que su inhibición produce una subida más fuerte de la  $[Ca^{2+}]_i$  que el bloqueo del NCX, es decir, tiene mayor efecto en la desregulación de la homeostasis del calcio citosólico. Por otra parte, la incubación con ácido ciclopiazónico no tiene un efecto significativo sobre los valores de  $[Ca^{2+}]_i$ , lo que indica que la contribución de la reserva intracelular de calcio del retículo endoplasmático no parece ser muy significativa para el mantenimiento de la homeostasis de la concentración del calcio citosólico en las CGN. En conjunto, nuestros resultados permiten alcanzar la conclusión de que son los sistemas de transporte de la membrana plasmática los más influyentes en el mantenimiento de la homeostasis de la concentración del calcio citosólico en estas neuronas. En este modelo celular y en las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, los L-VOCC y la PMCA son los sistemas más relevantes en la entrada y salida de este ión, respectivamente. Sin embargo, es la respuesta del NMDAr al L-glutamato y consecuentemente la transducción de señal vía calcio la que más se ve afectada al DIV10 cuando se rompe con M $\beta$ CD la integridad de los dominios enriquecidos en colesterol de la membrana plasmática. Los L-VOCC también responden a la M $\beta$ CD pero a una concentración de este agente mucho mayor que los NMDAr. Estos receptores son mucho más sensibles a este reactivo y con apenas 2,5 mM de M $\beta$ CD se eliminó el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  de las neuronas granulares del cerebelo inducido por la adición de L-glutamato extracelular. Por otra parte, los resultados de intensidad de microscopía de fluorescencia muestran que la intensidad de la señal de los L-VOCC monitorizados con ST-Bodipy DHP aumenta tras el tratamiento con la M $\beta$ CD. Este hecho podría ser interpretado como un indicio experimental de mayor agregación de los L-VOCC en los sub-microdominios, pero al analizar los resultados de FRET

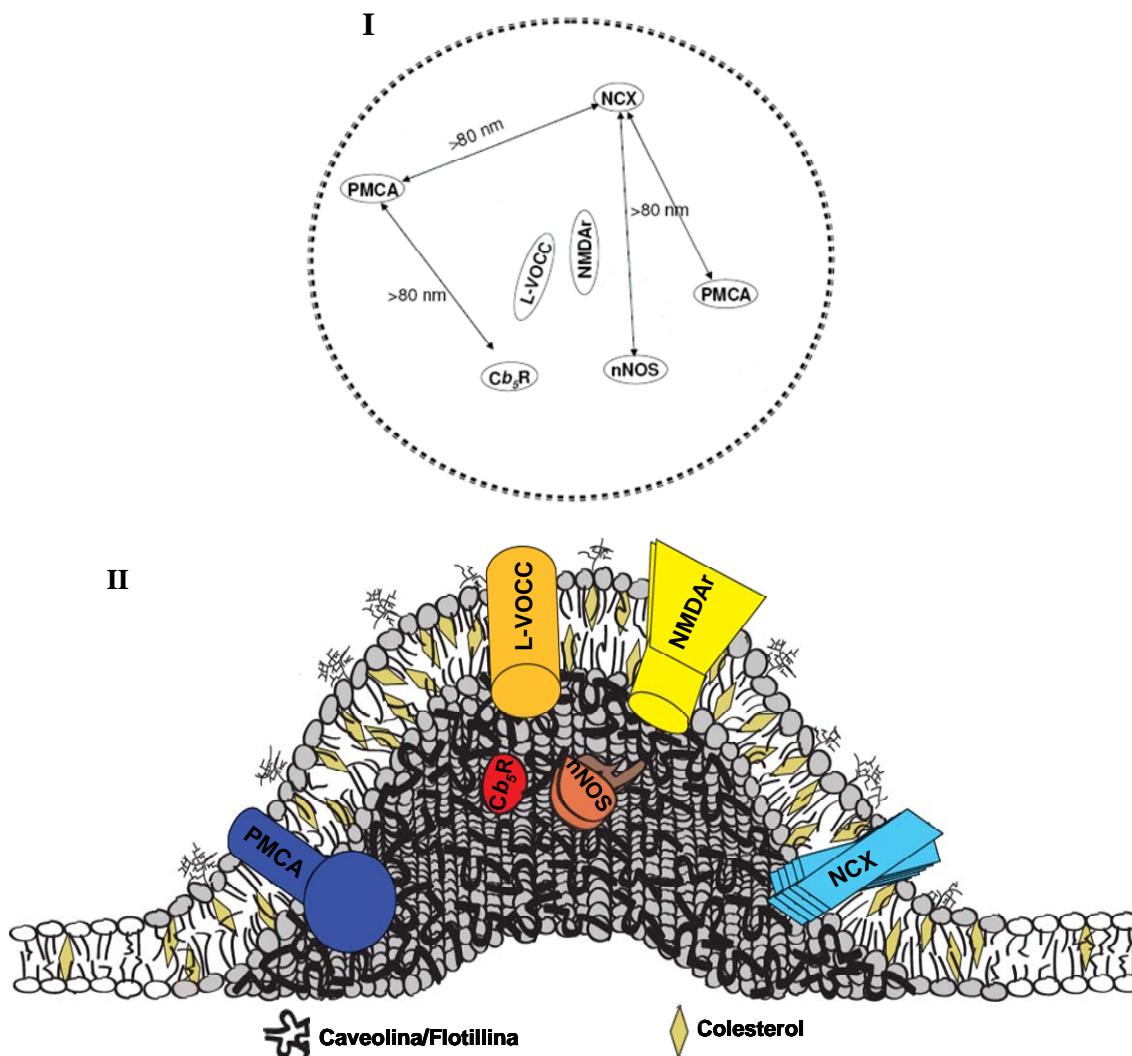
entre el L-VOCC y el NMDAr no se observa una diferencia significativa de la ratio roja/verde cuando la comparamos con la situación control (diferencia < 10%), y lo mismo ocurre al utilizar el par anti-NMDAr/Alexa488-IgG y la sonda fluorescente ST-Bodipy DHP. Por todo lo anterior, la hipótesis más razonable para explicar los cambios de fluorescencia de los L-VOCC es que al eliminar el colesterol de estos submicrodominios el sitio de unión de la dihidropiridina al canal esté más accesible o en un entorno modificado que incremente el rendimiento cuántico de la fluorescencia de ST-Bodipy DHP.

Cambios en el nivel de fosforilación de los L-VOCC podrían mediar estos efectos de la depleción de colesterol, porque ha sido descrito que el colesterol regula la fosforilación de los L-VOCC por la PKA (Tsujikawa *et al.*, 2008) y que la regulación de eventos de señalización por parte de la PKA mediados por la caveolina-1 puede tener una importancia extrema en células con elevada abundancia en caveolas (Razani *et al.*, 1999). Por tanto, estudiamos el efecto de inhibidores específicos de las proteínas quinasas en la entrada de calcio a través de los dos principales sistemas de transporte de la membrana plasmática de las CGN analizados en este trabajo, los L-VOCC y NMDAr. A pesar de que varios estudios han publicado resultados de modulación por fosforilación del receptor NMDA (Leonard y Hell, 1997; Tingley *et al.*, 1997; Grueter *et al.*, 2006), en las condiciones experimentales utilizadas en esta Tesis Doctoral no hemos encontrado un efecto significativo de los inhibidores específicos de la PKA, de la CaMKII y de la PKC en la entrada de calcio a través del NMDAr estimulada por el L-glutamato. Tampoco en la actividad de la PMCA se ha observado efecto alguno con repercusión sobre la homeostasis del calcio citosólico. Sin embargo, hemos observado una fuerte modulación de los L-VOCC por la presencia de inhibidores específicos de la PKA y de la CaMKII, mientras que no hemos encontrado efecto por parte de la PKC. La PKA y la CaMKII afectan la actividad de los L-VOCC y cuando se añadieron al medio los inhibidores de estas dos proteínas quinasas se ha observado una fuerte disminución de la entrada de calcio a través de estos canales. Ha sido reportado que la PKA fosforila en la Ser478 y Ser479 de la subunidad  $\beta_2$  y que mutaciones en la Ser478 y 479 de la subunidad  $\beta_2$  eliminan completamente el incremento de corrientes de calcio inducidas por la PKA a través de los L-VOCC (Bünemann *et al.* 1999). También la CaMKII incrementa la entrada de calcio por los L-VOCC, siendo la Thr498 de la subunidad  $\beta_{2a}$  su principal diana de fosforilación, si bien la región clave para la regulación de los L-VOCC por parte de la CaMKII incluye dominios de las subunidades

$\beta_{1b}$  y  $\beta_{2a}$  (Grueter *et al.*, 2008). Por consiguiente, nuestros resultados son consistentes con los datos bibliográficos que han demostrado la importancia de la fosforilación por la PKA o por la CaMKII para la actividad del L-VOCC. Por otra parte, nuestros resultados demuestran la presencia de los L-VOCC en los *rafts* lipídicos purificados de las CGN, lo que está de acuerdo con los resultados de Grueter *et al.* (2006) mostrando la co-localización de la CaMKII con la subunidad  $\beta_{2a}$  del L-VOCC. De hecho, ha sido sugerido que esta proximidad tiene un claro sentido funcional ya que la regulación del influjo de calcio vía los L-VOCC es controlada por microdominios subcelulares específicos y por mecanismos múltiples que permiten la asociación de la CaMKII con las subunidades del canal (Grueter *et al.*, 2008), así como de otras proteínas de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como es el caso de la calcineurina (Tandam *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010).

Los resultados y conclusiones derivadas de la distribución de proteínas responsables de la homeostasis del calcio neuronal y de la producción de ROS, junto con los resultados de la modulación de calcio por diversos agentes apoyan la hipótesis de que, en procesos neurodegenerativos, los sub-microdominios asociados a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática pueden tener un papel importante en la alteración sostenida de la homeostasis del calcio citoplasmático neuronal vía el anión superóxido, el óxido nítrico y un agente fuertemente neurotóxico derivado de los dos anteriores, el peroxinitrito. Como una subida sostenida y general del calcio citoplasmático es muy nocivo para las neuronas, una estructura tridimensional focalizada en la membrana plasmática neuronal para la regulación redox y para la modulación por fosforilación de los sistemas de transporte de calcio más relevantes en el control de la homeostasis de calcio citoplasmático traería muchas ventajas para un rápido, fino y delicado ajuste de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la estrecha ventana que media entre la excitabilidad neuronal y la supervivencia. Nótese que debido al papel importante de la respiración mitocondrial en la producción de ROS en neuronas y en otras células de mamíferos (Beal, 2000; Lin y Beal, 2006; Hamanaka y Chandel, 2010), la vida neuronal se ve fuertemente amenazada por una hiperactividad metabólica, como lo ilustra la excitotoxicidad del glutamato. Una estructura conteniendo los sistemas redox/calcio focalizados en los puntos donde se inician las vías de señalización de calcio es probablemente la estrategia mas eficiente para garantizar una respuesta modulada y rápida en células como las neuronas que tienen que dar respuesta integradora a una enorme cantidad de posibles señales de las células vecinas, sin morir por hiperactividad metabólica. Desde esta perspectiva

conceptual, cabría esperar que cuanto más alterados estén estos microsensors moleculares redox/calcio de la membrana plasmática, más propensas serán las neuronas a iniciar procesos neurodegenerativos. Esta es una posibilidad desafiante que emerge de este trabajo de Tesis Doctoral y que, en nuestra opinión, merece ser explorada en futuros estudios.



**Figura 5.1** – Diagrama esquemático representando la proximidad relativa, calculada a partir de los datos de FRET, del NMDAr, LVOCC, PMCA, NCX, nNOS y Cb<sub>5</sub>R dentro de los submicrodominios asociados a *rafts* lipídicos. Panel I – Mapa de los límites de los *rafts* lipídicos delineados por un círculo en punteado. Panel II - Vista lateral de una sección simulada de los *rafts* lipídicos incluyendo los componentes moleculares objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Los *rafts* lipídicos se representan a través de un aumento del espesor de la bicapa lipídica siendo los lípidos polares componentes de estos y cuya cabeza lipídica está marcada de color gris. La zona de la superficie externa de la membrana plasmática más saliente (con ramificaciones) representa a los glicolípidos.



## ***6. Conclusiones/Conclusions***



## Conclusiones

1- Se han desarrollado nuevas aproximaciones de análisis y cálculo de la eficiencia de FRET en cultivos celulares utilizando anticuerpos marcados con sondas fluorescentes que forman pares donador/aceptor.

2- Los principales sistemas de entrada y de salida de calcio de la membrana plasmática de CGN maduras *in vitro* (L-VOCC, NMDAr, PMCA y NCX) están asociados con los sub-microdominios de tipo *rafts* lipídico enriquecidos en caveolinas y están separados entre sí por distancias dentro del intervalo que permite FRET utilizando anticuerpos marcados con sondas fluorescentes. La organización de estas proteínas en los sub-microdominios, que se deriva de los análisis de las eficiencias de FRET realizados en este trabajo, indica que estos sub-microdominios pueden generar microcompartimentos dinámicos y transitorios de calcio elevado en las proximidades de la membrana plasmática neuronal. Adicionalmente, la alta proximidad entre el L-VOCC y el NMDAr (un hecho puesto de manifiesto por primera vez en este trabajo) junto con su capacidad para estimular la secreción de L-glutamato elevando localmente la concentración del calcio citosólico, nos ha llevado a sugerir una nueva función para los L-VOCC, la de ser potenciadores de la activación de los NMDAr vecinales.

3- Los principales sistemas redox asociados a la membrana plasmática neuronal (nNOS y *Cb<sub>5</sub>R*) están presentes en los sub-microdominios de tipo *rafts* lipídicos enriquecidos en caveolinas y están separados entre sí por distancias dentro del intervalo que permite FRET utilizando anticuerpos marcados con sondas fluorescentes. Además el tratamiento con agentes oxidantes y desestabilizadores del citoesqueleto de actina no altera la presencia de estas dos proteínas en los mismos indicando una fuerte y estable asociación de estas proteínas a estos sub-microdominios.

4- El principal sistema de entrada de calcio para modular la homeostasis de la concentración del calcio citosólico en las CGN al DIV 8 es el L-VOCC, pero su actividad no se ve afectada por la depleción de colesterol de los *rafts* lipídicos. Sin embargo agentes moduladores de citoesqueleto de actina, agentes oxidantes y la actividad de las proteínas quinasas PKA y CaMKII afectan profundamente su función

revelando la elevada sensibilidad de estos canales a cambios de microentorno, oxidación y fosforilación en las neuronas granulares de cerebelo. Por el contrario la actividad de los NMDAr (el sistema de entrada de calcio de mayor potencial excitatorio en estas neuronas) no se ve alterada por inhibición de la PKA, PKC y CaMKII, pero son extremadamente sensibles a la depleción de colesterol de los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática, lo que pone de manifiesto la importancia del microentorno para la actividad de esta proteína en las neuronas granulares de cerebelo.

5- La proximidad de los sistemas generadores de ROS con los sistemas de transporte de calcio de la membrana plasmática neuronal (a una distancia menor de 80 nm), así como la elevada sensibilidad de los L-VOCC y de los NMDAr a las ROS y al microentorno celular, sugiere que estos sub-microdominios de la membrana plasmática tienen un importante papel en la modulación redox de la homeostasis del calcio citosólico en neuronas y en su desregulación por estrés oxidativo.

6- La alta proximidad entre L-VOCC, NMDAr y nNOS descrita por primera vez en esta Tesis Doctoral permite visualizar un ciclo de amplificación y control cruzado calcio/óxido nítrico dentro de estos sub-microdominios. Por un lado, la nNOS se verá más fuertemente y rápidamente estimulada al estar expuesta a una concentración de calcio en el microentorno superior a la citosólica promedio. Por otro lado, esta proximidad potencia la inhibición del NMDAr por el óxido nítrico producido por la nNOS, un mecanismo de retroinhibición beneficioso para evitar que se alcance el nivel de calcio citosólico que dispara la muerte neuronal por excitotoxicidad.

## Conclusions

1- New approaches have been developed for analysis and calculation of FRET efficiency in cell cultures using antibodies labeled with fluorescent probes forming donor/acceptor pairs.

2- The main calcium transport systems for entry and exit of calcium across the plasma membrane of mature CGN *in vitro* (L-VOCC, NMDAR, PMCA and NCX) are associated with lipid rafts-like sub-microdomains enriched in caveolins, being separated by a distance between them within the range detected by FRET using fluorescent-labeled antibodies. The organization of these proteins in these sub-microdomains, derived from the analysis of FRET efficiencies achieved in this work, suggests that these sub-microdomains can generate dynamic and transient high calcium microcompartments in the vicinity of the neuronal plasma membrane. Additionally, the high proximity between L-VOCC and NMDAr (a fact revealed for the first time in this work) along with its ability to stimulate the secretion of L-glutamate by a local increase of cytosolic calcium concentration has led us to suggest a new function of L-VOCC, namely, to potentiate the activation of vicinal NMDAr's.

3- The primary redox systems associated with the neuronal plasma membrane (nNOS and Cb<sub>5</sub>R) are present in the sub-microdomains associated with lipid rafts enriched in caveolins and are at FRET distance using fluorescent-labeled antibodies from each other. In addition, the treatment with oxidizing and actin cytoskeleton destabilizing agents do not alter the presence of these two proteins in these domains, indicating a strong and stable association of these proteins to these sub-microdomains.

4- The calcium entry system most relevant for the modulation of the homeostasis of cytosolic calcium concentration in CGN at DIV 8 is L-VOCC, but its activity is not affected by cholesterol depletion of lipid rafts. However, agents that modulate actin cytoskeleton, oxidizing agents and the activity of protein kinases PKA and CaMKII largely affect their function revealing the high sensitivity of these channels to microenvironmental changes, oxidation and phosphorylation in CGN. By contrast, the NMDAr activity (the calcium entry system of higher excitatory potential for these

neurons) is not altered by inhibition of PKA, PKC and CaMKII, but they are extremely sensitive to the depletion of cholesterol from lipid rafts of the plasma membrane, pointing out the importance of the microenvironment for the activity of this protein in CGN.

5- The proximity of ROS-generating systems with calcium transport systems in the neuronal plasma membrane (at less than 80 nm distance), as well as the high sensitivity of the L-VOCC and NMDAr to ROS and the cellular microenvironment, suggests that these plasma membrane sub-microdomains have an important role in the redox modulation of cytosolic calcium homeostasis in neurons and on their deregulation by oxidative stress.

6- The high proximity between L-VOCC, NMDAr and nNOS described for the first time in this Ph. D. work unravels a cycle of amplification and cross-control of calcium/nitric oxide within these sub-microdomains. On the one hand, nNOS will be strongly and quickly stimulated as it is exposed in this microenvironment to a concentration of calcium higher than the cytosolic average calcium concentration. On the other hand, this proximity potentiates the NMDAr inhibition by nitric oxide produced by nNOS, a beneficial feedback-inhibition mechanism to avoid reaching the level of cytosolic calcium that triggers a excitotoxic neuronal death.

## ***7. Bibliografía***





- Anderson, R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* **67**: 199–225.
- Aosaki, T. y Kasai, H. (1989) Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflugers Arch.* **414**: 150-156.
- Arakawa, Y., Nishijima, C., Shimizu, N. y Urushidani, T. (2002) Survival-promoting activity of nimodipine and nifedipine in rat motoneurons: implications of an intrinsic calcium toxicity in motoneurons. *J Neurochem.* **83**: 150-156.
- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Azzariti, A., Marra, E. y Passarella, S. (2000) Cytochrome c is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death. *J Biol Chem.* **275**: 37159– 37166.
- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E. y Passarella, S. (2001) Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* **497**: 1-5.
- Baggaley, E., McLarnon, S., Demeter, I., Varga, G. y Bruce, J.I.E. (2007) Differential Regulation of the Apical Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by Protein Kinase A in Parotid Acinar Cells. *J Biol Chem.* **282**: 37678–37693.
- Balazs, R., Jorgensen, O.S. y Hack, N. (1988) N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience.* **27**: 437–451.
- Balijepalli, R.C., Foell, J.D., Hall, D.D., Hell, J.W. y Kamp T.J. (2006) Localization of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for  $\beta_2$ -adrenergic regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**: 7500–7505.
- Bao, F. y Liu, D. (2002) Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience.* **115**: 839-849.
- Bartlett, G. R. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* **234**: 466-468.
- Bastiaanse, E.M.L., Höld, K.M. y Van der Laarse, A. (1997) The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc Res.* **33**: 272–283.
- Beal, M.F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **23**: 298–304.
- Beal, M.F.(2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* **32**: 797-803.

- Beckman, J. S. (1994) Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann NY Acad Sci.* **738**: 69–75.
- Benowitz, L.I. y Routtenberg, A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.* **20**: 84-91.
- Berger, W., Prinz, H., Striessnig, J., Kang, H.C., Haugland, R. y Glossmann, H. (1994) Complex molecular mechanism for dihydropyridine binding to L-type  $\text{Ca}^{2+}$ - channels as revealed by fluorescence energy transfer. *Biochemistry.* **33**: 11875–11883.
- Berridge, M.J. (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron.* **21**: 13-26.
- Berridge, M.J., Lipp, P. y Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**: 11-21.
- Bessho, Y., Nawa, H. y Nakanishi, S. (1994) Selective up-regulation of an NMDA receptor subunit mRNA in cultured cerebellar granule cells by  $\text{K}^{+}$ -induced depolarization and NMDA treatment. *Neuron.* **12**: 87-95.
- Besshoh, S., Chen S., Brown, I.R. y Gurd, J.W. (2007) Developmental Changes in the Association of NMDA Receptors With Lipid Rafts. *J Neurosci Res.* **85**:1876–1883.
- Bizat, N., Hermel, J-M., Boyer, F., Jacquard, C., Créminon, C., Ouary, S., Escartin, C., Hantraye, P., Krajewski, S. y Brouillet, E. (2003) Calpain Is a Major Cell Death Effector in Selective Striatal Degeneration Induced *In Vivo* by 3-Nitropropionate: Implications for Huntington's Disease. *J Neurosci.* **23**: 5020-5030.
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S.E., Akhter, S.A. y Schwartz, A. (2005) The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest.* **115**: 3306–3317.
- Bolaños, J.P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B. y Heales, S.J. (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* **68**: 2227-2240.
- Bonfoco, E., Leist, M., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. y Nicotera P. (1996) Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem.* **67**: 2484–2493.
- Bossuyt, J., Taylor, B.E., James-Kracke, M. y Hale, C.C. (2002) Evidence for cardiac sodium-calcium exchanger association with caveolin-3. *FEBS Lett.* **511**: 113-117.
- Brauns, T., Prinz, H., Kimball, S.D., Haugland, R.P., Striessnig, J. y Glossmann, H. (1997) L-type calcium channels: binding domains for dihydropyridines and benzothiazepines are located in close proximity to each other. *Biochemistry.* **36**: 3625-3631.

- Brazer, S.C., Singh, B.B., Liu, X., Swaim, W. y Ambudkar, I.S. (2003) Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem.* **278**: 27208–27215.
- Brecht, D.S. y Snyder, S.H. (1994) Nitric-oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* **63**: 175–195.
- Brenman, J.E. y Brecht, D.S. (1997) Synaptic signalling by nitric-oxide. *Curr Opin Neurobiol.* **7**: 374–378.
- Brimecombe, J.C., Potthoff, W.K. y Aizenman, E. (1999) A critical role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit (NR) 2A in the expression of redox sensitivity of NR1/NR2A recombinant NMDA receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **291**: 785-792.
- Brini, M. y Carafoli, E. (2000) Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci.* **57**: 354-370.
- Brini, M. (2009) Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role. *Pflugers Arch.* **457**: 657–664.
- Brown, A.M., Deutch, A.Y. y Colbran, R.J. (2005) Dopamine depletion alters phosphorylation of striatal proteins in a model of Parkinsonism. *Eur J Neurosci.* **22**: 247–256.
- Bruce, J.I.E., Yule, D.I. y Shuttleworth, T.J. (2002)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase-A modulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in parotid acinar cells. *J Biol Chem.* **277**: 48172–48181.
- Bu, J., Bruckner, S.R., Sengoku, T., Geddes, J.W. y Estus, S. (2003) Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* **72**: 185-190.
- Bünemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T. y Hosey, M.M. (1999) Functional Regulation of L-type Calcium Channels via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of the  $\beta 2$  Subunit. *J Biol Chem.* **274**: 33851–33854.
- Buerton, R.M. (1963) The action of neuraminidase from *Clostridium Perfringens* on gangliosides. *J Neurochem.* **10**: 503-512.
- Cahalan, M.D. (2009) STIMulating store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Nat Cell Biol.* **11**: 669–677.
- Cai, J. y Jones, D. P. (1998) Superoxide in apoptosis: mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem.* **273**: 11401– 11404.

- Calin-Jageman, I., Yu, K., Hall, R.A., Mei, L. y Lee, A. (2007) Erbin enhances voltage-dependent facilitation of Cav1.3  $\text{Ca}^{2+}$  channels through relief of an autoinhibitory domain in the Cav1.3  $\alpha 1$  subunit. *J Neurosci.* **27**: 1374–1385.
- Carafoli, E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev.* **71**: 129–153.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D. y Brini, M. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **36**: 107-260.
- Cassarino, D.S. y Bennett, J.P. Jr. (1999) An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* **29**: 1-25.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **16**: 521–555.
- Centeno, F. y Gutierrez-Merino, C. (1992) Location of functional centers in the microsomal cytochrome P450 system. *Biochemistry.* **31**: 8473-8481.
- Clark, N.C., Nagano, N., Kuenzi, F.M., Jarolimek, W., Huber, I., Walter, D., Wietzorrek, G., Boyce, S., Kullmann, D.M., Striessnig, J. y Seabrook, G.R. (2003) Neurological phenotype and synaptic function in mice lacking the CaV1.3 alpha subunit of neuronal L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Neuroscience.* **120**: 435 – 442.
- Choi, D.W. (1998a) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* **11**: 465-469.
- Choi, D.W. (1998b) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**: 623–634.
- Choi, D.W. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxia-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* **18**: 58-60.
- Churchward, M.A., Rogasevskaja, T., Höfgen, J., Bau, J. y Coorsen, J.R. (2005) Cholesterol facilitates the native mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered membrane fusion. *J Cell Sci.* **118**: 4833-4848.
- Coan, E.J., Saywood, W. y Collongridge, G.L. (1987) MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* **80**: 111-114.
- Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W. y Lisanti, P. (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* **84**: 1341-79.

- Colyer, J. (1998) Phosphorylation states of phospholamban. *Ann NY Acad Sci.* **853**: 79-91.
- Condrescu, M. y Reeves, J.P. (2006) Actin-dependent regulation of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**: C691-701.
- Coue, M., Brenner, S.L., Spector, I. y Korn, E.D. (1987) Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**: 316-318.
- Cull-Candy, S.G. y Usowicz, M.M. (1987) Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. *Nature.* **325**: 525-528.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. y Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* **11**: 327–335.
- Darley-USmar, V., Wiseman, H. y Halliwell, B. (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* **369**: 131– 135.
- Davare, M.A., Dong, F., Rubin, C.S. y Hell, J.W. (1999) The A-kinase anchor protein MAP2B and cAMP-dependent protein kinase are associated with class C L-type calcium channels in neurons. *J Biol Chem.* **274**: 30280–30287.
- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Tran van Minh, A., Foucault, I., Koch, D., Pratt, W.S., Saibil, H.R. y Dolphin, A.C. (2006) The calcium channel  $\alpha_2$  subunit partitions with  $\text{CaV}2.1$  into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *J Neurosci.* **26**: 8748–8757.
- Day, M., Wang, Z., Ding, J., An, X., Ingham, C.A., Shering, A.F., Wokosin, D., Ilijic, E., Sun, Z., Sampson, A.R., Mugnaini, E., Deutch, A.Y., Sesack, S.R., Arbuthnott, G.W. y Surmeier, D.J. (2006) Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci.* **9**: 251–259.
- De Jongh, K.S., Murphy, B.J., Colvin, A.A., Hell, J.W., Takahashi, M. y Catterall, W.A. (1996) Specific phosphorylation of a site in the full-length form of the  $\alpha_1$  subunit of the cardiac L-type calcium channel by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Biochemistry.* **35**: 10392–103402.
- Delínte-Ramirez, I., Salcedo-Tello, P. y Bermudez-Rattoni, F. (2008) Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *J Neurochem.* **106**: 1658–1668.
- Delint-Ramirez, I., Fernández, E., Bayés, A., Kicsi, E., Komiyama, N.H. y Grant, S.G.N. (2010) *In Vivo* Composition of NMDA Receptor Signaling Complexes Differs between Membrane Subdomains and Is Modulated by PSD-95 and PSD-93. *J Neurosci.* **30**: 8162– 8170.

- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Haller, H. y Kurzchalia, T.V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene disrupted mice. *Science*. **293**: 2449-2452.
- Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B. y Ohshima, H. (1999) Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cell Mol Life Sci*. **55**: 1068–1077.
- Duenas, A.M., Goold, R. y Giunti, P. (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*. **129**: 1357-1370.
- Duggan, J., Jamal, G., Tilley, M., Davis, B., McKenzie, G., Vere, K., Somekh, M.G., O'Shea, P. y Harris, H. (2008) Functional imaging of microdomains in cell membranes. *Eur Biophys J*. **37**: 1279-1289.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. y Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. **25**: 533–535.
- Evans, G.J. y Pocock, J.M. (1999) Modulation of neurotransmitter release by dihydropyridine-sensitive calcium channels involves tyrosine phosphorylation. *Eur J Neurosci*. **11**: 279-292.
- Feng, C., Tollin, G., Holliday, M.A., Thomas, C., Salerno, J.C., Enemark, J.H. y Ghosh, D.K. (2006) Intraprotein electron transfer in a two-domain construct of neuronal nitric oxide synthase: the output state in nitric oxide formation. *Biochemistry*. **45**: 6354-6362.
- Fielding, C. J. y Fielding, P. E. (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res*. **38**: 1503–1521.
- Fiskum, G. (2000) Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *J Neurotrauma*. **17**: 843-855.
- Forti, L., Tottene, A., Moretti, A. y Pietrobon, D. (1994) Three novel types of voltage-dependent calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci*. **14**: 5243-5256.
- Fox, A.P., Nowycky, M.C. y HTsien, R.WH. (1987) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol*. **394**: 173-200.
- Fra, A.M., Masserini, M., Palestini, P., Sonnino, S. y Simons, K. (1995) A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett*. **375**: 11-14.
- Franklin, J.L. y Johnson, E.M. Jr. (1992) Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci*. **15**: 501-508.

- Franklin, J.L. y Johnson, E.M. Jr. (1994) Block of neuronal apoptosis by a sustained increase of steady-state free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **345**: 251-256.
- Franks, J.J., Wamil, A.W., Janicki, P.K., Horn, J.L., Franks, W.T., Janson, V.E., Vanaman, T.C. y Brandt, P.C. (1998) Anesthetic-induced alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in neural cells: a temperature-sensitive process that is enhanced by blockade of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoforms. *Anesthesiology.* **89**: 149-164.
- Gabella, G. (1971) Caveolae intracellulares and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *J Cell Sci.* **8**: 601–609.
- Gallo, V., Kingsbury, A., Balázs, B. y Jorgensen, O.S. (1987) The Role of Depolarization in the Survival and Differentiation of Cerebellar Granule Cells in Culture. *J Neurosci.* **7**: 2203-2213.
- Gao, T., Yatani, A., Dell'Acqua, M.L., Sako, H., Green, S.A., Dascal, N., Scott, J.D., y Hosey, M.M. (1997) cAMP-dependent regulation of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. *Neuron.* **19**: 185–196.
- Gao, Z.Y., Xu, G., Stwora-Wojczyk, M.M., Matschinsky, F.M., Lee, V.M. y Wolf, B.A. (1998) Retinoic acid induction of calcium channel expression in human NT2N neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* **247**: 407-413.
- Gao, L., Blair, L.A., Salinas, G.D., Needleman, L.A. y Marshall, J. (2006) Insulin-like growth factor-1 modulation of  $\text{CaV}1.3$  calcium channels depends on  $\text{Ca}^{2+}$  release from  $\text{IP}_3$ -sensitive stores and calcium/calmodulin kinase II phosphorylation of the  $\alpha$ 1 subunit EF hand. *J Neurosci.* **26**: 6259–6268.
- Gaudreault, S.B., Dea, D. y Poirier, J. (2004) Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging.* **25**: 753-759.
- Garcia-Bereguian, M.A., Samhan-Arias, A.K., Martin-Romero, F.J. y Gutierrez-Merino, C. (2008) Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Antioxid Redox Signal.* **10**: 31-42.
- Garcia-Martin, E. y Gutierrez-Merino, C. (1996) Rate of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange across the plasma membrane of synaptosomes measured using the fluorescence of chlorotetracycline. Implications to calcium homeostasis in synaptic terminals. *Biochim Biophys Acta.* **1280**: 257-264.

- Garcia, M.L. y Strehler, E.E. (1999) Plasma membrane calcium ATPases as critical regulators of calcium homeostasis during neuronal cell function. *Front Biosci.* **4**: D869–882.
- Gardoni, F., Bellone, C., Cattabeni, F. y Di Luca, M. (2001) Protein Kinase C Activation Modulates  $\alpha$ -Calmodulin Kinase II Binding to NR2A Subunit of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Complex. *J Biol Chem.* **276**: 7609–7613.
- Gärtner, A., Collin, L. y Lalli, G. (2006) Nucleofection of primary neurons. *Methods Enzymol.* **406**: 374–388.
- Genova, M. L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti, C.G. y Lenaz, G. (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron – sulfur cluster N2. *FEBS Lett.* **505**: 364–368.
- Gill, D.L., Chueh, S.H. y Whitlow, L.C. (1984) Functional importance of the synaptic plasma membrane calcium pump and sodium-calcium exchanger. *J Biol Chem.* **259**: 10807-10813.
- Goeger, D.E., Riley, R.T., Dorner, J.W. y Cole, R.J. (1988) Cyclopiazonic acid inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol.* **37**: 978-981.
- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. (2001) Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science.* **292**: 1310–1312.
- Gromadzinska, E., Lachowicz, L., Walkowiak, B. y Zylinska, L. (2001) Calmodulin effect on purified rat cortical plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in different phosphorylation states. *Biochim Biophys Acta.* **1549**: 19-31.
- Grueter, C.E., Abiria, S.A., Dzhura, I., Wu, Y., Ham, A-J. L., Mohler, P.J., Anderson M.E. y Colbran, R.J. (2006) L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Facilitation Mediated by Phosphorylation of the  $\beta$  Subunit by CaMKII. *Mol Cell.* **23**: 641–650.
- Grueter, C.E., Abiria, S.A., Wu, Y., Anderson, M.E. y Colbran, R.J. (2008) Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with isoforms of voltage-gated calcium channel beta subunits. *Biochemistry.* **47**: 1760-1767.
- Guerini, D., García-Martín, E., Gerber, A., Volbracht, C., Leist, M., Merino, G.C. y Carafoli, E. (1999) The expression of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$ . *J Biol Chem.* **274**: 1667-1676.



- Gulbins, E. y Li, P.L. (2006) Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **290**: R11–26.
- Gutierrez-Martin, Y., Martin-Romero, F.J., Henao, F. y Gutierrez-Merino, C. (2002) Synaptosomal plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO<sup>-</sup> pulses. *Free Radic Biol Med.* **32**: 46-55.
- Gutierrez-Martin, Y., Martin-Romero, F.J., Henao, F. y Gutierrez-Merino, C. (2005) Alteration of cytosolic free calcium homeostasis by SIN-1: high sensitivity of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels to extracellular oxidative/nitrosative stress in cerebellar granule cells. *J Neurochem.* **92**: 973-989.
- Gutierrez-Merino, C. (1981a) Quantitation of the Förster energy transfer for two-dimensional systems: I) Lateral phase separation in unilamellar vesicles formed by binary phospholipid mixtures. *Biophys Chem.* **14**: 247-257.
- Gutierrez-Merino, C. (1981b) Quantitation of the Förster energy transfer for two-dimensional systems: II) Protein distribution and aggregation state in biological membranes. *Biophys Chem.* **14**: 259–266.
- Gutierrez-Merino, C., Molina, A., Escudero, B., Diez, A. y Laynez, J. (1989) Interaction of local anesthetics with sarcoplasmic reticulum. Differential scanning calorimetry and fluorescence studies. *Biochemistry.* **28**: 3398–3406.
- Gutierrez-Merino, C., Centeno, F., Garcia-Martin, E. y Merino, J.M. (1994) Fluorescence energy transfer as a tool to locate functional sites in membrane proteins. *Biochem Soc Trans.* **22**: 784-788.
- Gutierrez-Merino, C. (2008) Redox modulation of neuronal calcium homeostasis and its deregulation by reactive oxygen species, in *Free Radicals in Biology and Medicine 2008*, (Gutierrez-Merino C. and Leeuwenburgh C., eds), pp. 67-101. Research Signpost, Kerala, India.
- Gutierrez-Merino, C., Lopez-Sanchez, C., Lagoa, R., Samhan-Arias, A.K., Bueno, C. y Garcia-Martinez, V. (2011) Neuroprotective actions of flavonoids. *Curr Med Chem.* **18**: 1195-1212.
- Hamanaka, R.B. y Chandel, N.S. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci.* **35**: 505-513.
- Haugland, R.P. (2005) *The Handbook: a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Techniques*. 10th ed. Carlsbad, CA, USA: Invitrogen Corp.

- Head, B.P. y Insel, P.A. (2007) Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol.* **17**: 51–57.
- Head, B.P., Patel, H.H., Tsutsumi, Y.M., Hu, Y., Mejia, T., Mora, R.C., Insel, P.A., Roth, D.M., Drummond, J.C. y Patel, P.M. (2008) Caveolin-1 expression is essential for N-methyl-D-aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death. *FASEB J.* **22**: 828–840.
- Heresco-Levy, U. y Javitt, D.C. (1998) The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated neurotransmission in the pathophysiology and therapeutics of psychiatric syndromes. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **8**: 141–152.
- Hering, H., Lin, C-C. y Sheng, M. (2003) Lipid Rafts in the Maintenance of Synapses, Dendritic Spines, and Surface AMPA Receptor Stability. *J Neurosci.* **23**: 3262–3271.
- Herrero, A. y Barja, G. (2000) Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* **32**: 609-615.
- Herreros, J., Ng, T. y Schiavo, G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell.* **12**: 2947-2960.
- Hidalgo, C. y Donoso, P. (2008) Crosstalk between calcium and redox signalling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* **10**: 1275-1312.
- Hockerman, G.H., Johnson, B.D., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (1995) Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem.* **270**: 22119-22122.
- Hudmon, A., Schulman, H., Kim, J., Maltez, J.M., Tsien, R.W. y Pitt, G.S. (2005) CaMKII tethers to L-type Ca<sup>2+</sup> channels, establishing a local and dedicated integrator of Ca<sup>2+</sup> signals for facilitation. *J Cell Biol.* **171**: 537–547.
- Huie, R. E. y Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* **18**: 195-199.
- Iadecola, C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* **20**: 132-139.
- Ischiropoulos, H., Duran, D. y Horwitz, J. (1995) Peroxynitrite-mediated inhibition of DOPA synthesis in PC12 cells. *J Neurochem.* **65**: 2366–2372.

- Jiang, L., Fernandes, D., Mehta, N., Bean, J.L., Michaelis, M.L. y Zaidi, A. (2007) Partitioning of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochem.* **102**: 378–388.
- Kamp, T.J. y Hell, J.W. (2000) Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circ Res.* **87**: 1095-1102.
- Kim, C., Crane, F.L., Faulk, W.P. y Morré, D.J. (2002) Purification and characterization of a doxorubicin-inhibited NADH-quinone (NADH-ferricyanide) reductase from rat liver plasma membranes. *J Biol Chem.* **277**: 16441–16447.
- Kindzelskii, A. y Petty, H.R. (2004) Fluorescence spectroscopic detection of mitochondrial flavoprotein redox oscillations and transient reduction of the NADPH oxidase-associated flavoprotein in leukocytes. *Eur Biophys J.* **33**: 291–299.
- Kirsch, M. y de Groot, H. (1999) Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **274**: 24664-24670.
- Knaus, H.G., Moshhammer, T., Friedrich, K., Kang, H.C., Haugland, R.P. y Glossmann, H. (1992) In vivo labeling of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by fluorescent dihydropyridines: evidence for a functional, extracellular heparin-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 3586–3590.
- Knowles, R.G. y Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* **298**: 249-258.
- Ko, M., Zou, K., Minagawa, H., Yu, W., Gong, J.S., Yanagisawa, K. y Michikawa, M. (2005) Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J Biol Chem.* **280**: 42759-42765.
- Kuszczak, I., Samson, S.E., Pande, J., Shen, D.Q. y Grover, A.K. (2011) Sodium–calcium exchanger and lipid rafts in pig coronary artery smooth muscle. *Biochim Biophys Acta.* **1808**: 589–596.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M. y Mishina, M. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature.* **358**: 36–41.
- Lagoa, R., Lopez-Sanchez, C., Samhan-Arias, A.K., Gañan, C.M., Garcia-Martinez, V. y Gutierrez-Merino, C. (2009) Kaempferol protects against rat striatal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem.* **111**: 473-487.
- Lee, T.S., Karl, R., Moosmang, S., Lenhardt, P., Klugbauer, N., Hofmann, F., Kleppisch, T. y Welling, A. (2006) Calmodulin kinase II is involved in voltage-

dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem.* **281**: 25560–25567.

- Lei, S.Z., Pan, Z.-H., Aggarwal, S.K., Chen, H.-S. V., Hartman, J., Sucher, N.J. y Lipton, S.A. (1992) Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* **8**: 1087-1099.

- Leonard, A.S. y Hell, J.W. (1997) Cyclic AMP-dependent Protein Kinase and Protein Kinase C Phosphorylate N-Methyl-D-aspartate Receptors at Different Sites. *J Biol Chem.* **272**: 12107–12115.

- Li, Y., Zhang, X., Liu, H., Cao, Z., Chen, S., Cao, B. y Liu, J. (2012) Phosphorylated CaMKII post-synaptic binding to NR2B subunits in the anterior cingulate cortex mediates visceral pain in visceral hypersensitive rats. *J Neurochem.* **121**: 662-671.

- Liao, G-Y. y Leonard, J.P. (1999) Insulin Modulation of Cloned Mouse NMDA Receptor Currents in *Xenopus* Oocytes. *J Neurochem.* **73**: 1510-1519.

- Lin, M.T. y Beal, M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* **443**: 787-795.

- Lipton, S.A., Chol, Y.-B., Pan, Z.-H., Lei, S.Z., Chen, H.-S.V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J. y Stamler, J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature.* **364**: 626–632.

- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z.L., Hermanowski-Vosatka, A., Cook, R.F. y Sargiacomo, M. (1994) Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* **126**: 111–126.

- Liu, J., Oh, P., Horner, T., Rogers, R.A. y Schnitzer, J.E. (1997) Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem.* **272**: 7211–7222.

- Liu, D., Ling, X., Wen, J. y Liu, J. (2000) The Role of Reactive Nitrogen Species in Secondary Spinal Cord Injury: Formation of Nitric Oxide, Peroxynitrite, and Nitrated Protein. *J Neurochem.* **75**: 2144–2154.

- Lucero, A.H. y Robbins, P.W. (2004) Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys.* **426**: 208-224.

- Macdonald, J.L. y Pike, L.J. (2005) A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.* **46**: 1061–1067.

- Marchetti, C. y Usai, C. (1996) High affinity block by nimodipine of the internal calcium elevation in chronically depolarized rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett.* **207**: 77-80.
- Maric, D., Maric, I. y Barker, J.L. (2000) Developmental changes in cell calcium homeostasis during neurogenesis of the embryonic rat cerebral cortex. *Cereb Cortex.* **10**: 561-573.
- Marletta, M.A. (1994) Nitric Oxide Synthase: Aspects Concerning Structure and Catalysis. *Cell.* **78**: 927-930.
- Marques-da-Silva, D., Samhan-Arias, A.K., Tiago, T. y Gutierrez-Merino, C. (2010) L-type calcium channels and cytochrome b5 reductase are components of protein complexes tightly associated with lipid rafts microdomains of the neuronal plasma membrane. *J Proteomics.* **73**: 1502-1510.
- Martin-Romero, F.J., Santiago-Josefat, B., Correa-Bordes, J., Gutierrez-Merino, C. y Fernandez-Salguero, P. (2000) Potassium-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells involves cell-cycle blockade at the G1/S transition. *J Mol Neurosci.* **15**: 155-165.
- Martin-Romero, F. J., Gutierrez-Martin, Y., Henao, F. y Gutierrez-Merino, C. (2002a) The NADH oxidase activity of the plasma membrane of synaptosomes is a major source of superoxide anion and is inhibited by peroxynitrite. *J Neurochem.* **82**: 604-614.
- Martin-Romero, F.J., Garcia-Martin, E. y Gutierrez-Merino, C. (2002b) Inhibition of the oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurochem.* **82**: 705-715.
- Martin-Romero, F.J., Samhan-Arias, A.K., Garcia-Bereguain, M.A. y Gutierrez-Merino, C. (2004a) Molecular biology of mammalian AFR reductases, in *Recent Research and Developments in Molecular Biology.* **2**: 29-52.
- Martin-Romero, F.J., Gutierrez-Martin, Y., Henao, F. y Gutierrez-Merino, C. (2004b) Fluorescence measurements of steady state peroxynitrite production upon SIN-1 decomposition: NADH versus dihydrodichlorofluorescein and dihydropyrene 123. *J Fluoresc.* **14**: 17-23.
- Mattson, M.P. y Chan, S.L. (2001) Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *J Mol Neurosci.* **17**: 205-224.
- Mattson, M.P. y Chan, S.L. (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium.* **34**: 385-397.
- Maxfield, F.R. y Tabas I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* **438**: 612-621.

- May, J.M. (1999) Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J.* **13**: 995–1006.
- McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W. y Yoshikami, D. (1987) Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* **84**: 4327-4331.
- McHugh, D., Sharp, E.M., Scheuer, T. y Catterall, W.A. (2000) Inhibition of cardiac L-type calcium channels by protein kinase C phosphorylation of two sites in the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 12334–12338.
- Michaelis, E.K., Michaelis, M.L., Chang, H.H. y Kitos, T.E. (1983) High affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J Biol Chem.* **258**: 6101-6108.
- Milstien, S., Sakai, N., Brew, B. J., Krieger, C., Vickers, J. H., Saito, K. y Heyes, M.P. (1994) Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in neurologic diseases. *J Neurochem.* **63**: 1178–1180.
- Mitterdorfer, J., Froschmayr, M., Grabner, M., Moebius, F.F., Glossmann, H. y Striessnig, J. (1996) Identification of PK-A phosphorylation sites in the carboxyl terminus of L-type calcium channel alpha 1 subunits. *Biochemistry.* **35**: 9400–9406.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. y Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science.* **256**: 1217–1221.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B. y Seeburg, P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* **12**: 529–540.
- Moosmang, S., Haider, N., Klugbauer, N., Adelsberger, H., Langwieser, N., Müller, J., Stiess, M., Marais, E., Schulla, V., Lacinova, L., Goebbels, S., Nave, K.A., Storm, D.R., Hofmann, F. y Kleppisch, T. (2005) Role of hippocampal  $\text{Ca}_v1.2$   $\text{Ca}^{2+}$  channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *J Neurosci.* **25**: 9883 – 9892.
- Morré, D.M., Lenaz, G. y Morré, D.J. (2000) Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol.* **203**: 1513–1521.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Weiland, F., Kurzchalia, T. y Simons, K. (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 10339–10343.

- Murata, T., Lin, M.I., Stan, R.V., Bauer, P.M., Yu, J. y Sessa, W.C. (2007) Genetic evidence supporting caveolae microdomain regulation of calcium entry in endothelial cells. *J Biol Chem.* **282**: 16631–16643.
- Murphy, M.P., Packer, M.A., Scarlett, J.L. y Martin, S.W. (1998) Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *General Pharmacology.* **31**: 179–186.
- Neher, E. (1998a) Vesicle pools and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron.* **20**: 389–399.
- Neher, E. (1998b) Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Cell Calcium.* **24**: 345–357.
- Nicoll, R.A. y Malenka, R.C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* **377**: 115–118.
- O'Connell, K.M.M., Martens, J.R. y Tamkun, M.M. (2004) Localization of ion channels to lipid raft domains within the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med.* **14**: 37–42.
- Oka, N., Yamamoto, M., Schwencke, C., Kawabe, J.I., Ebina, T., Ohno, S., Couet, J., Lisanti, M.P. y Ishikawa, Y. (1997) Caveolin interaction with protein kinase C: isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J Biol Chem.* **272**: 33416–33421.
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. y Nicotera, P. (1989) Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci.* **10**: 281–285.
- O-Uchi, J., Komukai, K., Kusakari, Y., Obata, T., Hongo, K., Sasaki, H. y Kurihara, S. (2005)  $\alpha 1$ -adrenoceptor stimulation potentiates L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current through  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent PK II (CaMKII) activation in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 9400–9405.
- Pani, B., Ong, H.L., Liu, X., Rauser, K., Ambudkar, I.S. y Singh, B.B. (2008) Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *J Biol Chem.* **283**: 17333–17340.
- Parekh, A.B. (2008)  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains near plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels: impact on cell function. *J Physiol.* **586**: 3043–3054.
- Parton, R.G. (2001) Cell biology. Life without caveolae. *Science.* **293**: 2404–2405.
- Pearson, H.A., Sutton, K.G., Scott, R.H. y Dolphin, A.C. (1995) Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in cultured rat cerebellar granule neurones. *J Physiol.* **482**: 493–509.

- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. y Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* **3**: 473-483.
- Pelkmans, L., Puntener, D. y Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* **296**: 535-539.
- Pike, L.J., Han, X., Chung, K.N. y Gross, R.W. (2002) Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry.* **41**: 2075-2088.
- Pike, L.J. (2006) Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res.* **47**: 1597–1598.
- Pinard, C.R., Mascagni, F. y McDonald, A.J. (2005) Neuronal localization of Cav1.2 L-type calcium channels in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.* **1064**: 52 – 55.
- Plummer, M.R. y Hess, P. (1991) Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature.* **351**: 657-659.
- Popescu, L.M., Diculescu, I., Zelck, U. y Ionescu, N. (1974) Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell Tissue Res.* **154**: 357–378.
- Pouvreau, S., Berthier, C., Blaineau, S., Amsellem, J., Coronado, R. y Strube, C. (2004) Membrane cholesterol modulates dihydropyridine receptor function in mice fetal skeletal muscle cells. *J Physiol.* **555**: 365-381.
- Prybylowski, K., Chang, K., Sans, N., Kan, L., Vicini, S. y Wenthold, R.J. (2005) The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron.* **47**: 845-857.
- Pulina, M.V., Rizzuto, R., Brini, M. y Carafoli, E. (2006) Inhibitory interaction of the plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers with the 14-3-3 proteins. *J Biol Chem.* **281**: 19645-19654.
- Puri, T.S., Gerhardstein, B.L., Zhao, X.L., Ladner, M.B. y Hosey, M.M. (1997) Differential effects of subunit interactions on protein kinase A- and C-mediated phosphorylation of L-type calcium channels. *Biochemistry.* **36**: 9605–9615.
- Raman, I.M., Tong, G. y Jahr, C.E. (1996)  $\beta$ -Adrenergic Regulation of Synaptic NMDA Receptors by cAMP-Dependent Protein Kinase. *Neuron.* **16**: 415–421.



- Randall, A. y Tsien, R.W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* **15**: 2995-3012.
- Randall, A.D. y Tsien, R.W. (1997) Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology.* **36**: 879-893.
- Razani, B., Rubin, C.S. y Lisanti M.P.(1999) Regulation of cAMP-mediated Signal Transduction via Interaction of Caveolins with the Catalytic Subunit of Protein Kinase A. *J Biol Chem.* **274**: 26353–26360.
- Razani, B., Woodman, S.E. y Lisanti, M.P. (2002) Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. *Pharmacol Rev.* **54**: 431–467.
- Ren, C., Zhang, J., Philipson, K.D., Kotlikoff, M.I., Blaustein, M.P. y Matteson, D.R. (2010) Activation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by protein kinase C is reduced in smooth muscle-specific  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **298**: H1484–1491.
- Resink, A., Villa, M., Benke, D., Möhler, H. y Balázs, R. (1995) Regulation of the Expression of NMDA Receptor Subunits in Rat Cerebellar Granule Cells: Effect of Chronic  $\text{K}^+$ -Induced Depolarization and NMDA Exposure. *J Neurochem.* **64**: 558–565.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W.C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. y Anderson, R. G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* **68**: 673-682.
- Samhan-Arias, A.K., Martin-Romero, F.J. y Gutierrez-Merino, C. (2004) Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for the plasma membrane NADH oxidase activity in the commitment of apoptosis. *Free Radic Biol Med.* **37**: 48-61.
- Samhan-Arias, A.K., Garcia-Bereguian, M.A., Martin-Romero, F.J. y Gutierrez-Merino, C. (2006) Regionalization of plasma membrane-bound flavoproteins of cerebellar granule neurons in culture by fluorescence energy transfer imaging. *J Fluoresc.* **16**: 393–401.
- Samhan-Arias, A.K., Duarte, R.O., Martin-Romero, F.J., Moura, J.J.G. y Gutierrez-Merino, C. (2008) Reduction of ascorbate free radical by the plasma membrane of synaptic terminals from rat brain. *Arch Biochem Biophys.* **469**: 243–254.
- Samhan-Arias, A.K., Garcia-Bereguian, M.A., Martin-Romero, F.J. y Gutierrez-Merino, C. (2009) Clustering of plasma membrane-bound cytochrome  $b_5$  reductase within ‘lipid rafts’ microdomains of the neuronal plasma membrane. *Mol Cell Neurosci.* **40**: 14–26.

- Samhan-Arias, A.K., Marques-da-Silva, D., Yanamala, N. y Gutierrez-Merino, C. (2012) Stimulation and clustering of cytochrome b(5) reductase in caveolin-rich lipid microdomains is an early event in oxidative stress-mediated apoptosis of cerebellar granule neurons. *J Proteomics*. **75**: 2934-2949.
- Sapphire, E.O., Parren, P.W.H.I., Barbas, C.F. 3rd, Burton, D.R. y Wilson, I.A. (2001) Crystallization and preliminary structure determination of an intact human immunoglobulin, b12: an antibody that broadly neutralizes primary isolates of HIV-1. *Acta Crystallographica*. **D57**: 168-171.
- Sato, Y., Sagami, I. y Shimizu, T. (2004) Identification of Caveolin-1-interacting Sites in Neuronal Nitric-oxide Synthase. *J Biol Chem*. **279**: 8827–8836.
- Schramm, M., Vajna, R., Pereverzev, A., Tottene, A., Klöckner, U., Pietrobon, D., Hescheler, J. y Schneider, T. (1999) Isoforms of  $\alpha 1E$  voltage-gated calcium channels in rat cerebellar granule cells--detection of major calcium channel  $\alpha 1$ -transcripts by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Neuroscience*. **92**: 565-575.
- Sée, V., Boutillier, A.-L., Bito, H. y Loeffler, J.-P. (2001) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *FASEB J*. **15**: 134-144.
- Seidler, N.W, Jona, I., Vegh, M. y Martonosill, A. (1989) Cyclopiazonic Acid Is a Specific Inhibitor of the  $Ca^{2+}$ -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*. **264**: 17816-17823.
- Sepúlveda, M.R., Berrocal-Carrillo, M., Gasset, M. y Mata, A.M. (2006) The plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem*. **281**: 447-453.
- Shmuel, M., Nodel-Berner, E., Hyman, T., Rouvinski, A. y Altschuler, Y. (2007) Caveolin-2 regulates endocytosis and trafficking of the M1 muscarinic receptor in MDCK epithelial cells. *Mol Biol Cell*. **18**: 1570-1585.
- Shvartsman, D.E., Gutman, O., Tietz, A. y Henis, Y.I. (2006) Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol. *Traffic*. **7**: 917-926.
- Simons, K. y Ehehalt, R. (2002) Cholesterol lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. **110**: 597-603.
- Slinchenko, N.N., Bratkova, N.F., Kosterin, S.A., Zimina, V.P. y Chernysh, I.G. (1998) Effects of eosin Y on the catalytic and functional activities of  $Mg^{2+}$ ,ATP-

dependent calcium pump of smooth muscle cell plasma membrane. *Biochemistry*. **63**: 685-690.

- Slinchenko, N.M., Chernysh, I.H. y Kosterin, S.O. (2003) Effect of eosin Y on  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase of the smooth muscle sarcolemma. *Ukr Biokhim Zh*. **75**: 50-53.

- Smart, E.J., Ying, Y.S., Mineo, C. y Anderson, R.G.W. (1995a) A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 10104-10108.

- Smart, E.J., Ying, Y.S. y Anderson, R.G. (1995b) Hormonal regulation of caveolae internalization. *J Cell Biol*. **131**: 929–938.

- Smart, E.J., Ying, Y-S., Donzell, W.C. y Anderson, R.G.W. (1996) A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol from Endoplasmic Reticulum to Plasma Membrane. *J Biol Chem*. **271**: 29427–29435.

- Sonnino, S. y Prinetti, A. (2009) Sphingolipids and membrane environments for caveolins. *FEBS Lett*. **583**: 597-606.

- Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D. y Kashman, Y. (1989) Latrunculins-novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton*. **13**: 127-144.

- Strehler, E.E. y Zacharias, D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*. **81**: 21–50.

- Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem*. **47**: 819-846.

- Sun, Z.X., Zhou, Q.H. y Sui, S.F. (2005) Cholesterol depletion inhibits the degradation of amyloid beta-peptide in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurosci Lett*. **391**: 71-75.

- Suzuki, T., Du, F., Tian, Q-B., Zhang, J. y Endo, S. (2008)  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II $\alpha$  clusters are associated with stable lipid rafts and their formation traps PSD-95. *J Neurochem*. **104**: 596–610.

- Szabo, C., Ischiropoulos, H. y Radi, R. (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. **6**: 662-680.

- Tandan, S., Wang, Y., Wang, T.T., Jiang, N., Hall, D.D., Hell, J.W., Luo, X., Rothermel, B.A. y Hill J.A. (2009) Physical and Functional Interaction Between Calcineurin and the Cardiac L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channel. *Circ Res*. **105**: 51-60.

- Taverna, E., Saba, E., Rowe, J., Francolini, M., Clementi, F. y Rosa, P. (2004) Role of lipid microdomains in P/Q-type calcium channel (Cav2.1) clustering and function in presynaptic membranes. *J Biol Chem.* **279**: 5127-5134.
- Teubl, M., Groschner, K., Kohlwein, S.D., Mayer, B. y Schmidt, K. (1999) Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange facilitates Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* **274**: 29529-29535.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F. y Huttner, W.B. (2000) Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat Cell Biol.* **2**: 42-49.
- Tiago, T., Marques-da-Silva, D., Samhan-Arias, A.K., Aureliano, M. y Gutierrez-Merino, C. (2011) Early disruption of the actin cytoskeleton in cultured cerebellar granule neurons exposed to 3-morpholinosydnonimine-oxidative stress is linked to alterations of the cytosolic calcium concentration. *Cell Calcium.* **3**: 174-183.
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T. y Huganir, R.L. (1997) Characterization of Protein Kinase A and Protein Kinase C Phosphorylation of the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR1 Subunit Using Phosphorylation Site-specific Antibodies. *J Biol Chem.* **272**: 5157–5166.
- Toescu, E.C. (1999) Activity of voltage-operated calcium channels in rat cerebellar granule neurons and neuronal survival. *Neuroscience.* **94**: 561-570.
- Toselli, M., Biella, G., Taglietti, V., Cazzaniga, E. y Parenti, M. (2005) Caveolin-1 expression and membrane cholesterol content modulate N-type calcium channel activity in NG108-15 cells. *Biophys J.* **89**: 2443–2457.
- Tottene, A., Moretti, A. y Pietrobon, D. (1996) Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. *J Neurosci.* **16**: 6353-6363.
- Trackey, J.L., Uliasz, T.F. y Hewett, S.J. (2001) SIN-1-induced cytotoxicity in mixed cortical cell culture: peroxynitrite-dependent and –independent induction of excitotoxic cell death. *J Neurochem.* **79**: 445–455.
- Triffaró, J.M. y Vitale, M.L. (1993) Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* **16**: 466-472.
- Tsujikawa, H., Song, Y., Watanabe, M., Masumiya, H., Gupte, S.A., Ochi, R. y Okada, T. (2008) Cholesterol depletion modulates basal L-type Ca<sup>2+</sup> current and abolishes its  $\beta$ -adrenergic enhancement in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **294**: H285–292.

- Unlap, M.T., Bates, E., Williams, C., Komlosi, P., Williams, I., Kovacs, G., Siroky, B. y Bell, P.D. (2003)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger: Target for Oxidative Stress in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension*. **42**: 363-368.
- Valencia, A. y Morán, J. (2001) Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*. **64**: 284-297.
- Vallano, M.L., Lambolez, B., Audinat, E. y Rossier, J. (1996) Neuronal activity differentially regulates NMDA receptor subunit expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci*. **16**: 631-639.
- Valverde, R.H., Tortelote, G.G., Lemos, T., Mintz, E. y Vieyra, A. (2005)  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II is an essential mediator in the coordinated regulation of electrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by calmodulin and protein kinase A. *J Biol Chem*. **280**: 30611-30618.
- van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W. y van den Bosch, L. (2005) Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*. **2**: 147-159.
- van der Veen, R.C., Hinton, D.R., Incardonna, F. y Hofman, F.M. (1997) Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J Neuroimmunol*. **77**: 1-7.
- van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M. y Sandvig, K. (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol*. **13**: 92-100.
- Venema, V.J., Ju, H., Zou, R. y Venema, R.C. (1997) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem*. **272**: 28187-28190.
- Villalba, J. M., Navarro, F., Córdoba, F., Serrano, A., Arroyo, A., Crane, F.L. y Navas, P. (1995) Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: purification and role in trans-plasma-membrane electron transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 4887-4891.
- Volbracht, C., Chua, B.T., Ng, C.P., Bahr, B.A., Hong, W. y Li, P. (2005) The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J Neurochem*. **93**: 1280-1292.
- Vorherr, T., Kessler, T., Hofmann, F. y Carafoli, E. (1991) The calmodulin-binding domain mediates the self-association of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *J Biol Chem*. **266**: 22-27.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N.C. y Elson, E.L. (2001) Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci*. **114**: 1025-1036.

- Waseem, T.V., Kolos ,V.A., Lapatsina, L.P. y Fedorovich, S.V. (2006) Influence of cholesterol depletion in plasma membrane of rat brain synaptosomes on calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. *Neurosci Lett.* **405**: 106–110.
- Weick, J.P., Groth, R.D., Isaksen, A.L. y Mermelstein, P.G. (2003) Interactions with PDZ proteins are required for L-type calcium channels to activate cAMP response element-binding protein-dependent gene expression. *J Neurosci.* **23**: 3446–3456.
- Westermann, M., Steiniger, F. y Richter, W. (2005) Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its re-distribution after cholesterol depletion. *Histochem Cell Biol.* **123**: 613-620.
- Wright, M.V. y Kuhn, T.B. (2002) CNS neurons express two distinct plasma membrane electron transport systems implicated in neuronal viability. *J Neurochem.* **83**: 655–664.
- Xu, H., Ginsburg, K.S., Hall, D.D., Zimmermann, M., Stein, I.S., Zhang, M., Tandan, S., Hill, J.A., Horne, M.C., Bers, D. y Hell, J.W. (2010) Targeting of Protein Phosphatases PP2A and PP2B to the C-terminus of the L-type Calcium Channel Cav1.2. *Biochemistry.* **49**: 10298–10307.
- Yi, Y-H., Ho, P-Y., Chen, T-W., Lin, W-J., Gukassyan, V., Tsai, T-H., Wang, D-W., Lew, T-S., Tang, C-Y., Lo, S.L., Chen, T-Y., Kao, F-J. y Lin, C-H. (2009) Membrane Targeting and Coupling of NHE1-Integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3-NCX1 by Lipid Rafts following Integrin-Ligand Interactions Trigger  $\text{Ca}^{2+}$  Oscillations. *J Biol Chem.* **284**: 3855–3864.
- Zaidi, A. y Michaelis, M.L. (1999) Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Free Radic Biol Med.* **27**: 810-821.
- Zhang, H., Maximov, A., Fu, Y., Xu, F., Tang, T.S., Tkatch, T., Surmeier, D.J. y Bezprozvanny, I. (2005) Association of CaV1.3 L-type calcium channels with Shank. *J Neurosci.* **25**:1037–1049.
- Zurbriggen, R. y Dreyer, J.L. (1996) The plasma membrane NADH-diaphorase is active during selective phases of the cell cycle in mouse neuroblastoma cell line NB41A3. Its relation to cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* **1312**: 215–222.
- Zylinska, L., Guerini, D., Gromadzinska, E. y Lachowicz, L. (1998) Protein kinases A and C phosphorylate purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. *Biochim Biophys Acta.* **1448**: 99-108.

